

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

E.A.P. ODONTOLOGÍA

**Efecto de la membrana amniótica liofilizada como
barrera en el proceso de regeneración ósea en tibia de
conejo**

TESIS

para optar el grado de Cirujano Dentista

AUTOR

Jusef Yábar Condori

ASESOR

Sixto Grados Pomarino

Lima-Perú

2010

*A mis padres Ignacio y Sonia quienes
siempre me brindaron su apoyo
incondicional para seguir adelante.*

*A Dios por estar conmigo cada día de mi vida
y ser mi maestro ante cualquier circunstancia.*

*A mi hijo Rafaelito por ser mi nueva
razón de vivir y motivo de superación e
inspiración constante*

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, el Dr. Sixto Grados Pomarino, docente del departamento de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la UNMSM por su asesoramiento, ayuda y confianza durante todo el proceso de elaboración de la investigación.

A la Dra. Katia Medina Calderón, docente del Departamento de Estomatología Preventiva y Social de la Facultad de Odontología de la UNMSM por su orientación y ayuda durante el planeamiento y elaboración de la investigación, las cuales fueron fundamentales para el desarrollo de la misma.

Al Dr. Pastro Allende Rojas, docente del Post Grado de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la UNMSM y Jefe del Servicio de Periodoncia del CEMENA "Cirujano Mayor Santiago Távara", por su apoyo, instrucción y asesoramiento dentro de la institución ya mencionada.

A la Dra. Teresa Evaristo Chiyong, docente del departamento de Estomatología Preventiva y Social de la Facultad de Odontología de la UNMSM por su orientación en el análisis de los resultados.

A los miembros de la Comisión de Ética del CEMENA "Cirujano Mayor Santiago Távara" por la aprobación del trabajo de investigación realizado en las instalaciones de este prestigioso hospital.

Al C. de N. SN(M) José Flores Yábar, jefe del Servicio de Cirugía General del CEMENA "Cirujano Mayor Santiago Távara", por su apoyo y confianza durante las actividades realizadas en las instalaciones de Cirugía Experimental de la Institución ya mencionada, la cual estaba a cargo de su persona al momento de ejecución de la investigación.

A mis compañeras Katty Ríos y Priscely Manccini por su apoyo durante el procedimiento quirúrgico.

Al personal que labora en los servicios de Patología, Radiología y Cirugía Experimental del CEMENA "Cirujano Mayor Santiago Távara", quienes me brindaron todas las facilidades para realizar el estudio en sus instalaciones.

Este trabajo fue financiado con el apoyo del Fondo Promoción de Trabajo de Tesis de Pregrado del VRI-UNMSM

INDICE

[illegible]

A.2. Matrices	36
A.2.1. Orgánica	36
A.2.2. Inorgánica	39
B. Macroestructuras	39
B.1. Hueso Cortical	40
B.2. Hueso Trabecular	41
C. Factores Solubles	41
C.1. Proteínas Morfogenéticas	42
2.2.3. Regeneración Ósea Guiada (ROG)	42
2.2.3.3. Indicaciones y técnicas quirúrgicas	49
A. Regeneración de alvéolos frescos	49
B. Alvéolos frescos con 4 paredes	50
C. Alveolo con pérdida de paredes	51
D. Corrección de reborde.	51
2.2.4. Membranas para ROG	53
2.2.4.1. Características de las membranas utilizadas en regeneración	55
2.2.4.2. Tipos de membranas utilizadas en regeneración	56
A. Membranas no reabsorbibles	56
A.1. e-PTFE	56
B. Membranas reabsorbibles	58
B.1. Colágena	58

B.2. Ac. Poliglactico	60
B.3. Ac. Poliláctico	60
B.4. Poliglactina 910	61
2.2.5. Placenta	62
2.2.5.1. Clasificación	62
2.2.5.2. Estructura	64
A. Componente de origen materno	64
B. Componente de origen fetal	65
2.2.5.3. Funciones	67
A. Producción hormonal	67
B. Regulización de transporte electrolítico	68
C. Escasa inmunogenicidad	69
D. Impide apoptosis de células epiteliales	69
E. Permite una adecuada reepitelialización.	70
2.2.5.4. Implante de membrana amniótica	70
A. Mecanismo de acción de la membrana amniótica	71
B. Bases moleculares de la acción de la membrana amniótica	72 50
C. Extracción y conservación de la membrana amniótica	73
D. Proceso de liofilización	76
2.2.5.5. Implante de placenta	77
A. Hipertensión arterial	77

B. Irrigación y vasodilatación	78
C. Implante subdérmico de placenta y el control metabólico	78
D. Reparación celular y cicatrización	78
E. Medicina estética	79
2.3. Planteamiento del problema	79
2.4. Justificación	80
2.5. Objetivos	81
2.5.1. Objetivo general	81
2.5.2. Objetivos específicos	81
2.6. Hipótesis	82
III. MATERIALES Y MÉTODOS	82
3.1. Tipo de investigación	82
3.2. Población y muestra	83
3.3. Operacionalización de la variable	83
3.3.1. Variable Independiente	83
3.3.2. Variable dependiente	83
3.4. Materiales	90

3.5. Métodos	93
3.5.1. Procedimientos y Técnicas	93
A. Etapa preliminar	93
B. Procedimiento quirúrgico	94
C. Cuidados post operatorios	96
3.5.1. Recolección de datos	96
A. Procesamiento de datos	97
B. Análisis de resultados	97
IV. RESULTADOS	98
V. DISCUSION	106
VI. CONCLUSIONES	111
VII. RECOMENDACIONES	112
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
RESUMEN	121
ABSTRACT	123
ANEXOS	125

ÍNDICE DE CUADROS Y GRÁFICOS

CUADROS

CUADRO N°1. Efecto clínico, después de 6 semanas de cicatrización, observado a nivel del área de estudio y área control. 98

CUADRO N°2. Efecto radiográfico, después de 6 semanas de cicatrización, observaciones según el patrón de trabeculado a nivel del área de estudio y área control. 100

CUADRO N°3. Efecto histológico, observaciones microscópicas después de 6 semanas de cicatrización, según el grado de madurez ósea. 102

CUADRO N°4. Efecto histológico, observaciones microscópicas después de 6 semanas de cicatrización, según la continuidad del defecto con el hueso normal. 104

GRÁFICOS

GRÁFICO N° 1. Efecto clínico de la colocación de la membrana amniótica liofilizada

99

GRÁFICO N° 2. Efecto radiográfico de la colocación de la membrana amniótica liofilizada según *Taguchi y col*

101

GRÁFICO N° 3. Efecto histológico de la membrana amniótica liofilizada en relación al grado de madurez ósea.

103

GRÁFICO N° 4. Efecto histológico de la membrana amniótica liofilizada en lo referente a la continuidad del defecto - hueso normal

105

RESUMEN

En el terreno de la Periodoncia y de la Cirugía Oral y Maxilofacial nos encontramos con diferentes defectos óseos como resultado de procesos infecciosos o traumatismos, los cuales van a producir severos problemas funcionales y/o estéticos, que van a precisar de un tratamiento complejo. Durante los últimos años, las aportaciones a ésta materia se han realizado principalmente a través de la combinación de diversos biomateriales ya conocidos, dejando de lado la búsqueda de nuevos materiales que nos den otras alternativas de tratamiento y sobre todo que se encuentren al alcance de los pacientes. Es por esto que en este estudio estamos tratando de introducir la “membrana amniótica liofilizada” como un nuevo biomaterial de uso odontológico.

El presente estudio tuvo como objetivo investigar el efecto de la membrana amniótica liofilizada usada como barrera en el proceso de regeneración ósea guiada en tibia de conejos, para lo cual se utilizaron 10 conejos raza Nueva Zelanda de 2 a 2.5 Kg y de 4 a 6 meses de edad en los que se crearon defectos circulares de 4 mm de diámetro en la región mas inferior de las extremidades posteriores del conejo (tibia). Se formaron 2 grupos, un grupo control (no se colocó membrana) y 1 grupo de estudio (se colocó membrana amniótica liofilizada como barrera). Los animales fueron sacrificados a las 6 semanas de la cirugía, realizándose un análisis clínico, radiológico e histológico.

A las 6 semanas las muestras del grupo control mostró una pobre formación ósea, con una gran parte de tejido graso ocupando la zona del defecto. El grupo de

estudio mostró una regeneración ósea completa del defecto (clínicamente) a las 6 semanas. Radiográficamente se observó un cambio significativo del patrón de trabeculado óseo en las muestras del grupo de estudio comparada con el grupo control. Histológicamente se observó que la mayoría de las muestras del grupo de estudio tuvo una continuidad del 100% del defecto con el hueso normal, esto acompañado de la formación de hueso maduro compacto, mientras que en el grupo control la mayoría de las muestras se halló tan solo la presencia de algunos islotes de hueso inmaduro, con una formación moderada de hueso que a lo mucho llenada 1/3 del defecto creado.

Podemos llegar entonces a la conclusión que la regeneración ósea fue significativamente mayor en los defectos cubiertos con membrana amniótica liofilizada comparado con las muestras del grupo control en los cuales no se colocó ningún tipo de barrera.

ABSTRACT

In the field of Periodontics and Maxillofacial Surgery, we find many different bone defects as a result of infectious diseases or trauma, which will cause severe functional problems and / or aesthetic, which will require complex treatment. In recent years, contributions to this issue have done mainly through combinations of various biomaterials, but the investigators haven't looked for new materials to give us a new alternative of treatment and prices available to patients. That's why in this study we are trying to introduce "freeze-dried amniotic membrane" as a new biomaterial for dental applications.

The aim of this study was investigate the effect of freeze-dried amniotic membrane used as a barrier in the process of guided bone regeneration in rabbit tibia, for this study was used 10 New Zealand rabbits of 2 to 2.5 kg aged 4 to 6 months in which circular bone defects of 4 mm diameter were created in the lower region of the rabbit hindlimb (tibia). The rabbits were divided in 2 groups, a control group (no membrane was placed) and a study group (freeze-dried amniotic membrane was placed as a barrier). Animals were sacrificed at 6 weeks after surgery, analyzing clinical, radiological and histological study were done.

At 6 weeks the control group showed signs of poor bone formation, with a large proportion of adipose tissue occupying the defect area. The study group showed complete bone regeneration of the defect (clinically) at 6 weeks. X-rays reveals a

significant change in the pattern of trabecular bone samples in the study group compared with the control group. It was observed Histologically that most of the samples in the study group had a 100% continuity with normal bone defect, this coupled with the compact mature bone formation, whereas in the control group, most samples were found only the presence of some islands of immature bone, with a moderate bone formation that filled at most 1 / 3 the bone defect created.

The conclusion is that bone regeneration was significantly higher in the defects covered with freeze-dried amniotic membrane compared with samples from the control group in which we didn't put any kind of barrier.

I. INTRODUCCIÓN

La Regeneración Ósea Guiada es una secuencia lógica y natural de los principios creados para la Regeneración Tisular Guiada (RTG), conseguida con el objetivo de complementar la terapia periodontal reconstruyendo los efectos causados por la periodontitis en el aparato de sustentación del diente.¹

Esta RTG tuvo resultados positivos que aprobaron la técnica cuando fue estudiada en animales. Los estudios clínicos en humanos confirmaron los resultados obtenidos en animales y su uso en Periodoncia pasó a ser rutina en aquellos casos en los cuales estaba indicada la técnica. El éxito de esta técnica, basada en la promoción de nuevo ligamento periodontal y biológicamente de cemento y hueso, despertó la atención de los investigadores interesados en conseguir aumento de hueso en otras situaciones clínicas.²

Es así que nació la regeneración ósea guiada (ROG), que se fundamenta en la utilización de sistemas de barrera mediante membranas que aíslan un determinado defecto óseo con la intención de evitar el crecimiento de tejidos con capacidad de reparación rápida, como el tejido conectivo, que interfieren con el potencial osteogénico del defecto.

La membrana utilizada en nuestro estudio es una lámina de amnios liofilizada y esterilizada con rayos gamma, la cual es ofrecida por el Banco de Tejidos del

Instituto Nacional de Salud del Niño (INSS), Institución encargada de la producción de este biomaterial con la ayuda del Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN).

Esta “membrana amniótica liofilizada” hasta la actualidad ha sido utilizada por los especialistas de Cirugía Plástica y de Oftalmología, en el tratamiento de pacientes quemados y reconstrucciones de córnea respectivamente.

Mediante este trabajo de investigación estamos tratando de introducir el uso de esta membrana amniótica liofilizada como barrera en el proceso de regeneración ósea guiada.

II. MARCO TEORICO

2.1 ANTECEDENTES

GRANDINI S. Y COL (1975) Estudiaron la cicatrización de alvéolos de ratones y mostraron su secuencia histológica, realizando observaciones en periodos de 4 días, 1 semana, 2 semanas y 3 semanas. Llegando a la conclusión que cuando un alveolo completa su cicatrización habrá perdido una parte considerable de la formación ósea porque además de la reabsorción que ocurre en la superficie del alveolo, el conjuntivo formado ocupará la parte más coronal y parte del área central del alveolo. ⁶

GOTTLOW J. y col. (1984) condujeron un estudio en monos donde eliminaron las coronas de los dientes y cubrieron las raíces con membranas conforme a los principios de RTG. Las raíces permanecieron sumergidas durante 3 meses. Notaron que en las áreas donde había quedado suficiente espacio entre las membranas y las raíces se había formado una cantidad considerable de hueso y concluyeron que los principios sugeridos para regeneración periodontal podrían utilizarse para la técnica que posteriormente se denominó Regeneración Ósea Guiada (ROG). Las células que ocupaban el espacio eran Originarias del hueso y del ligamento y tenían ésta capacidad de formación. ⁷

DAHLIN y col. (1988) perforaron las mandíbulas de ratones de lado a lado en ambas hemiarcadas y procedieron a proteger con una membrana la entrada de las perforaciones en una de las hemiarcadas. Después de 6 semanas, se observó que las perforaciones donde se habían utilizado membranas estaban casi completamente cerradas por hueso mientras que en el lado control había una cantidad significativa de tejido blando ocupando el centro de las perforaciones, aún después de esperar un período de cicatrización de 9 semanas, siendo este resultado insatisfactorio.⁸

DAHLIN, C. y col (1989) colocaron implantes en la tibia de los conejos, dejando una parte expuesta y recubriéndolos con membranas de teflón. Después de 6 semanas las roscas expuestas de los implantes donde se colocaron las membranas estaban cubiertas por nuevo hueso, mientras que en el lado control la misma cantidad de roscas expuestas estaban cubiertas por tejido conectivo joven.⁹

BECKER, W. y col (1990) realizaron un estudio en perros, en el cual se colocaron implantes dejando una parte expuesta, un grupo de implantes fueron tratados conjuntamente con ROG y en otro grupo se procedió solamente al cierre de la herida, después del tiempo de cicatrización se observó formación ósea de 1.37mm al usar la técnica de ROG sobre implantes, mientras que solo 0.23mm al no emplear ROG. La diferencia siempre estuvo ocupada por tejido conectivo.¹⁰

SEIBERT, J. y col. (1990) realizaron un estudio con el objetivo de evaluar el potencial de reconstrucción de los defectos óseos localizados, para lo cual crearon

dichos defectos en maxilar de perros, tanto superior como inferior, de un promedio de 13 x 7 x 3.5 mm, uno en cada hemiarcada y combinaron el uso de membranas y diversos materiales de relleno. Los animales fueron sacrificados a los 90 días, mostrando al análisis histológico que el espacio había sido relleno por hueso joven e histológicamente activo. ¹¹

KOSTOPOULOS, L. y col (1994) lograron aumentar verticalmente la mandíbula de ratones en un estudio conducido con membranas reabsorbibles. Los resultados presentados en estudios conducidos en animales confirmaron los hallazgos clínicos obtenidos anteriormente e incentivaron la aplicación en humanos. Verificaron los resultados clínicos aparentes a través de reentrada quirúrgica. Evaluaron el volumen de hueso en 19 pacientes al momento de retirar la membrana en períodos entre 3 y 8 meses. En 6 pacientes las membranas tuvieron que ser removidas precozmente entre 3 y 5 meses y la formación de hueso varió entre 0 y 60%. En los pacientes restantes, en los cuales las membranas permanecieron en posición durante 6 a 8 meses, el resultado demostró un relleno óseo entre 90 y 100%. Después de un período de observación de 30 meses, los autores concluyeron que la Regeneración Ósea Guiada es un procedimiento previsible en condiciones de cicatrización normal. ¹²

KOSTOPOULOS & KARRING (1994) utilizaron membranas reabsorbibles para cubrir la entrada de perforaciones en mandíbula de ratones. En este estudio los defectos fueron estandarizados y el análisis histológico fue más detallado. La formación de

hueso en el lado donde se utilizó membrana fue gradual a partir desde el séptimo día hasta el día 180 alcanzando un 85% de cierre de la perforación. En el lado control, la regeneración ósea fue efectiva durante el primer mes, alcanzando sólo el 48% de cierre al final del estudio de 180 días permaneciendo el resto del defecto ocupado por tejido blando.¹³

BUSTER D. y col. (1999) realizaron un estudio en 40 pacientes, a los cuales se les colocó implantes en un segundo procedimiento quirúrgico, demostrando la eficacia y la predictibilidad de los autoinjertos óseos en bloque combinados con membrana de PTFE, lo cual se evidenció en la reentrada quirúrgica, obteniendo en promedio un aumento del grosor del reborde de 3.5 mm.¹⁴

NIKOLAOS D. y col (2005) realizaron un experimento en ratas tratando de evaluar la estabilidad a largo plazo de los autoinjertos óseos en bloque. Para lo cual se dividió a los animales en 2 grupos: a un grupo de se le colocaron injertos de calota por periodos de 5 y 11 meses, y al otro grupo se le colocaron los mismos injertos con la diferencia de la colocación de una membrana de PTFE -e. El resultado demostró un mejor resultado a largo plazo de los injertos colocados conjuntamente con la membrana siguiendo los principios de ROG.¹⁵

STANGOIANNIS-DRUYA (2004) Se investigó la eficacia del injerto de membrana amniótica como una terapia complementaria tras la remoción del pterigión recidivante comparando el resultado clínico con el auto injerto. Para esto se

analizaron 60 ojos de pacientes a los cuales se les practicó excisión quirúrgica de la hiperplasia fibrovascular nasal recidivante, seleccionados por azar simple, 30 ojos fueron sometidos a remoción de pterigión con técnica de injerto de membrana amniótica, y 30 ojos recibieron auto injerto de conjuntiva. Los resultados fueron los siguientes: Al quinto mes postoperatorio, se evidenció 3 casos (10%) de recurrencia en el grupo de injerto de membrana amniótica (3/30) y 1 caso (3%) de recurrencia en el grupo de auto injerto conjuntival (1/30). No ocurrió ninguna complicación en ambos grupos.¹⁶

VON ARX T. y col. (2006) realizaron un estudio en 42 pacientes con distrofia horizontal ósea severa de reborde alveolar, los cuales eran candidatos a colocación de implantes después de un aumento horizontal de reborde, utilizaron muestras obtenidas del mentón y de la zona retromolar y las fijaron al sitio receptor con tornillos, cubriéndolas con membrana de colágeno. Se esperó aproximadamente 5.8 meses, se midieron el ancho de los rebordes antes del procedimiento y después del tiempo de cicatrización, los resultados fueron los siguientes: el promedio del ancho de los rebordes antes de la intervención fue de: 3.06 mm, en la reentrada clínica después de 5.8 meses el promedio de grosor de los rebordes fue: 7.66 mm. Demostrando que los autoinjertos óseos en bloque colocados conjuntamente con la membrana de colágeno tienen un alto grado de predictibilidad en cuanto al aumento horizontal de reborde alveolar.¹⁷

MAJLUF y col. (2007) realizaron un estudio clínico en el cual se evaluó la efectividad de la membrana de aluminio (alúmina) en la regeneración ósea de alvéolos colapsados y alvéolos en los que se colocaron implantes. Se vieron un total de 5 pacientes con 7 sitios estudiados de los cuales 3 correspondieron a 1 solo paciente. En cada sitio se colocó un implante de titanio del sistema HIS y una membrana no biodegradable de óxido de aluminio (Allumina®), la cual fue retirada a las 14 semanas. Se mostraron resultados favorables, llegando a la conclusión que la membrana de óxido de aluminio es capaz de evitar la migración de células epiteliales y del tejido conectivo, permitiendo incluso en los casos donde se expuso la membrana la reparación de las dehiscencias producidas al momento de instalación de los implantes, a pesar de no utilizar material de injerto bajo ella, quedando el espacio creado, ocupado por el coágulo, lo cual hipotéticamente favorecería la concentración de los factores de crecimiento y por lo tanto la osteogénesis.¹⁸

HAMMERLE C. y col. (2008) realizaron un estudio en 20 pacientes, los cuales presentaban deficiencia ósea en las áreas de colocación de los implantes. Los pacientes fueron tratados con injerto de hueso bovino liofilizado mineralizado particulado, cubierto con membrana de colágeno. No se observaron dehiscencias de colgajo ni exposiciones de membrana. Se esperó aproximadamente de 9 a 10 meses. En todos los casos después de la cirugía regenerativa el grosor del reborde fue suficiente para la colocación de implantes. Hubo un aumento de 3.2 mm a 6.9 mm en promedio de los pacientes en estudio.¹⁹

PERAL y col. (2008) realizaron un estudio en ratas en los cuales realizaron defectos circulares de 4mm en ambos lados de la mandíbula. Se formaron 4 grupos, un grupo control y 3 grupos experimentales. Los animales fueron sacrificados a las 3 y 6 semanas de la cirugía, realizándose un análisis radiológico e histológico. Los defectos control no mostraron formación ósea, apareciendo una reparación por tejido fibroso. La membrana de hueso utilizada de forma aislada, actuó como una barrera eficaz excluyendo los tejidos no osteogénicos, pero no se produjo reparación total del defecto en ningún caso. El grupo de Colloss® y membrana, mostró una regeneración ósea completa del defecto a las 6 semanas. El grupo de NovaBone® y membrana, no mostró formación ósea, apareciendo las partículas del biomaterial ocupando el defecto. ⁴

2.2 BASES TEÓRICAS

2.2.1. INGENIERÍA TISULAR

2.2.1.1. PRINCIPIOS BÁSICOS DE REGENERACIÓN

El término ingeniería tisular fue originalmente utilizado para describir los tejidos producidos en cultivos por células desarrolladas en varias matrices porosas absorbibles.

Recientes estudios han mostrado que las células óseas pueden proliferar y mantener su fenotipo cuando son cultivadas en substratos bidimensionales y

matrices porosas tridimensionales y geles in vitro. Esto ha sentado las bases para la ingeniería tisular, el cual ahora incluye la implantación de matrices porosas, solas o desarrolladas con células, para facilitar la regeneración tisular in vivo. ²⁰

2.2.1.2. CICATRIZACIÓN DE TEJIDOS: REPARACIÓN VS. REGENERACIÓN

La cicatrización de tejidos se da por regeneración o reparación. El resultado final de la reparación es un tejido fibroso, mientras que el producto final de la regeneración es un tejido con características indistinguibles del original. El problema con el tejido fibroso es que no permite la normal restauración de las propiedades físicas y fisiológicas. ²¹

Los tejidos están compuestos de células, matriz extracelular insoluble y moléculas solubles que sirven como reguladores de la función celular (generalmente polipéptidos y eicosanoides). Un requisito para la regeneración es el potencial de las células parenquimales para la división. Las células son clasificadas en lábiles, estables y permanentes. Las células lábiles están continuamente sufriendo división, las células estables pueden ser estimuladas para entrar en división, y las células permanentes nunca se dividen. ²⁰

En el adulto, los tejidos compuestos de células lábiles (tales como la epidermis) y las células estables (tejido conectivo incluyendo el hueso) pueden regenerar;

mientras que los tejidos conformados por células permanentes (tejido nervioso y muscular cardíaco) no lo hacen. ²⁰

Los factores importantes que influyen en el curso de la regeneración es el entorno vascular y mecánico. En tejidos avasculares con baja capacidad mitótica, no ocurre regeneración, formando un defecto. ²¹

Una estrategia ha sido identificar los factores que interfieren con estos procesos y modular la respuesta regenerativa por medio de la adición de células exógenas, matrices análogas o substitutos, y factores de crecimiento ²¹

2.2.1.3. MATRICES PARA REGENERACIÓN DE TEJIDOS

Incluye fosfatos de calcio sintéticos y naturales, de ácido poliláctico y glicólico, y polímeros naturales (colágeno y fibrina). Estos materiales deben tener una microestructura y composición química requerida para un crecimiento celular normal así como de su función. ²⁰

Una matriz debe jugar roles importantes en el proceso de regeneración:

- Puede reforzar estructuralmente el sitio del defecto y prevenir la distorsión de los tejidos circundantes.

- La matriz puede servir como una barrera para impedir el crecimiento de otras estructuras. El concepto de regeneración tisular guiada está basado en parte en la prevención de un crecimiento gingival debido a un colapsamiento dentro del tejido periodontal.

- Las matrices puede servir como un soporte para la migración y proliferación de células in vivo o para células sembradas in vitro.

- La matriz puede servir como un regulador insoluble de la función celular mediante su interacción con ciertas integrinas y otras células receptoras.²⁰

2.2.1.4. PRINCIPIOS DE INGENIERÍA DE TEJIDOS

Toda una serie de especificaciones para una serie de materiales substitutos en injertos óseos han incluido la fuerza del material de la matriz, con el principal objetivo de emplear sustancias resistentes para un inmediato soporte de cargas. El hecho de poseer mayor resistencia los convierte en materiales muy rígidos debido a su alto módulo de elasticidad, cuya desventaja radica en la alteración de la distribución de fuerzas mecánicas en los tejidos circundantes, lo que afecta en la inducción de stress para la remodelación del hueso neoformado. Si esto sucede en una matriz no reabsorbible, significa que los efectos adversos en la remodelación

persistirán indefinidamente. Esta remodelación puede resultar en regiones osteopénicas alrededor del sitio implantado, incrementando el riesgo de fractura.²⁰

2.2.1.5. CÉLULAS EXÓGENAS PARA LA INGENIERÍA DE TEJIDOS

En algunos tejidos tales como el hueso, el número y actividad mitótica de las células precursoras es tan alto que hay normalmente una amplia fuente de células endógenas para poblar las estructuras implantadas para la regeneración de tejido. En muchas circunstancias, las matrices también sirven para facilitar la regeneración. Las células exógenas y factores mitogénicos pueden también ser necesarios en casos especiales en estos tejidos, cuando la proliferación de las células precursoras se impide o su entorno extracelular ha sido disminuido por la cirugía previa o concomitante enfermedad.²⁰

Cuando hay indicaciones para células exógenas o reguladores solubles, su incorporación en matrices es generalmente requerida para que asegure su fijación al sitio de tratamiento. Una alternativa está en inyectar una suspensión celular en un compartimiento sellado conteniendo el defecto.²⁰

Actualmente, las células alogénicas y autólogas del tejido a ser regenerado, crecen en un cultivo que ha sido sintetizado en vitro, están siendo investigadas para la regeneración de una variedad de tejidos. Hay ventajas y desventajas en este enfoque. Cuando las células alogénicas son usadas, el potencial de respuesta

inmune y transmisión de enfermedad debe ser considerado. Aspectos relacionados al uso de células autólogas incluyen requerimientos de la morbilidad de sitio donante.²²

Recientemente, se ha propuesto que las stem cells del estroma de la médula pueden usarse como precursor para muchos tejidos conjuntivos. Sin embargo, todavía no se ha demostrado que las condiciones para la diferenciación de estas células pueden ser confiablemente implementadas y que el estado de diferenciación deseado puede mantenerse.²¹

2.2.1.6. REGULADORES SOLUBLES PARA FACILITAR LA REGENERACIÓN

Las moléculas solubles, inyectadas solas o unidas al biomaterial usado como sistema de entrega, han sido investigadas:

(1) Para estimular la división de células nuevas y que estas se infiltren en el defecto (factores de crecimiento).

(2) Para estimular la diferenciación de ciertas células a lo largo de un camino específico (factores de diferenciación tales como la proteína morfogenética ósea).

(3) Para estimular la angiogénesis.

(4) Para servir como quimioatractivo de la célula específica. ²⁰

Una variedad amplia de factores de crecimiento ha sido considerada para aplicaciones dentales y ortopédicas. Polipéptidos tales como factores de crecimiento derivados de plaquetas se ha mostrado para jugar un papel importante en la cicatrización. ²¹

Una reciente revisión del papel de los factores de crecimiento para el tejido periodontal notó los efectos de varios factores sobre la mitosis, migración, síntesis de matriz, y diferenciación de células de ligamento periodontal y osteoblastos. ²²

La manipulación de tejidos promete solucionar problemas en la odontología que no ha sido adecuadamente dirigido mediante el uso de dispositivos de colocación permanente. El desafío será seleccionar la óptima combinación de matriz, células, y reguladores solubles para un particular problema clínico. ²²

Para algunos tejidos conectivos del sistema músculo esquelético, incluyendo el sistema dental, que tiene microestructuras que reflejan el ambiente mecánico,

puede ser más ventajoso regenerar el tejido en vivo que diseñar el tejido in vitro para su subsiguiente implantación.²¹

El material poroso que servirá como matriz para facilitar esta regeneración debe tener ciertas características químicas y propiedades mecánicas. Un enfoque ha sido emplear sustancias que sirven como análogos de matriz extracelular tejido a ser regenerado.²⁰

En el caso de tejidos óseos, el hueso natural mineral -inorgánico- ha demostrado ser eficaz en varios estudios animales experimentales y estudios clínicos. Para ciertas indicaciones en que el abastecimiento de células endógenas precursoras ha sido comprometido por enfermedad o cirugía anterior, puede ser necesario preparar la matriz, con anterioridad a la implantación, con células exógenas o para servir como vehículo de entrega para factores de crecimiento y diferenciación.²⁰

2.2.2. BIOLOGIA DE LA CURACION OSEA: SU IMPACTO EN LA TERAPIA CLINICA

Los conocimientos contemporáneos sobre biología celular han ampliado el entendimiento y apreciación de la complejidad de la curación ósea. Este entendimiento está siendo explotado para desarrollar terapias. Por esto, el objetivo de este capítulo es integrar los conceptos de embriología y estructura ósea con los procesos de curación ósea para dar un marco adecuado a la terapia clínica racional.²¹

2.2.2.1. JERARQUIA ESTRUCTURAL:

El hueso puede ser categorizado en cuatro componentes microestructurales: células, matriz orgánica, matriz inorgánica y factores solubles. Los componentes microestructurales están integrados en distintas jerarquías macroestructurales: hueso cortical y trabecular, las que a su vez pueden ser sub-categorizadas.²¹

A. MICROESTRUCTURAS

A.1. Células

Las células óseas se hallan dentro del propio tejido óseo o en el estroma conjuntivo de la médula ósea, rico en células mesenquimales pluripotenciales indiferenciadas (mesenchymal stem cells). Desde los trabajos de Friedenstein (1976) se conoce que estas stem cells pueden dar origen a cinco estirpes celulares distintas: fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos, en respuesta a diferentes señales moleculares que inician la cascada de activación de diferentes genes.²³

A.1.1. Osteoblastos.

Los osteoblastos son células grandes (20-30 μm), de forma poliédrica, con citoplasma basófilo y con un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso de tamaño importante. Proceden de las células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivasculares²⁴. Emiten procesos

citoplasmáticos hacia la matriz, que comunican con la red de osteocitos y con osteoblastos vecinos. Los osteoblastos y osteocitos se comunican entre sí por proteínas transmembrana o integrinas, que actúan de enlace entre células o entre una célula y la matriz extracelular, permitiendo el paso de mensajeros como calcio, citoquinas o prostaglandinas. En estas células la conexión intercelular es la Conexina.²⁵

Los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica o sustancia osteoide a un ritmo de 2 a 3 μm por día y expresan una enzima característica la fosfatasa alcalina (ALP), que permite la mineralización a un ritmo de 1-2 μm por día. Actualmente, se sabe que:

- 1.- sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso,
- 2.- dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular,
- 3.- contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide, gracias a la fosfatasa alcalina,
- 4.- median en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas y
- 5.- sintetizan factores de crecimiento.²⁶

La vida media de los osteoblastos humanos es de 1 a 10 semanas, al término de las cuales pueden desaparecer por mecanismos de apoptosis, transformarse en células limitantes o de revestimiento (bone lining cells) o en osteocitos (15 %)²⁷. Ambos tipos celulares representan estadios más avanzados de maduración. Las células limitantes son células elongadas y planas, con un núcleo en forma de huso, sin apenas organelas. Pueden expresar los marcadores osteoblásticos anteriormente citados como sialoproteína ósea, osteopontina, osteonectina, y fosfatasa alcalina

así como el receptor de parathormona (PTH). Permanecen a lo largo de la superficie endóstica, constituyendo con el endostio una capa protectora de la superficie ósea, que juega un papel importante en la activación del remodelado óseo.²⁵

A.1.2. Osteocitos.

Una vez mineralizada la matriz, algunos osteoblastos quedan atrapados dentro, transformándose en osteocitos. Los osteoblastos, osteoclastos y células limitantes se hallan en la superficie ósea, mientras que los osteocitos están en el interior. Los osteocitos son las células más abundantes del hueso (10 veces más que los osteoblastos). Poseen forma estrellada y su cuerpo se sitúa en el interior de lagunas u osteoplasmas y los procesos citoplasmáticos se comunican entre sí a través de los conductos calcóforos que están llenos de fluido óseo extracelular. De esta forma, los osteocitos se organizan formando un sincitio de células interconectadas que representa una única estructura, con la ventaja de que existe una gran superficie de contacto en el interior y hacia la superficie ósea, para asegurarse oxígeno y nutrientes. Cuando se produce un trauma en el hueso, el cese de la circulación sanguínea origina hipoxia y necrosis de los osteocitos que estén a más de 0.1 mm de un capilar intacto.²⁸

Los osteocitos también participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide, pero se cree que su función principal es la de controlar el remodelado

óseo, detectando las variaciones mecánicas de las cargas, fenómeno denominado mecanotransducción.²⁹

Los osteocitos constituyen el estadio final desde la línea osteoblástica y son incapaces de renovarse. Poseen los mismos marcadores que los osteoblastos, pero tienen como marcador específico el CD44, receptor de membrana que se expresa fuertemente en osteocitos y es negativo en osteoblastos y células limitantes.²⁸

A.1.3. Osteoclastos.

Las células encargadas de la reabsorción son los osteoclastos. Se trata de células grandes (100 μm), multinucleadas, ricas en mitocondrias y vacuolas. Los osteoclastos contienen fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), que permite la desfosforilación de las proteínas, cuya actividad es aprovechada para su identificación, tanto in vivo como in vitro. Además tienen receptores para calcitonina²⁵.

Los osteoclastos proceden de células madre hematopoyéticas medulares denominadas "Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos" (CFU-GM), precursoras de macrófagos y monocitos³⁰.

Los osteoclastos tienen dos especializaciones en la membrana: un borde en cepillo, que es donde tiene lugar la reabsorción y una zona clara, rica en microfilamentos, con integrinas que sirven de anclaje a la matriz. Para ello, los osteoclastos se movilizan hacia la zona a reabsorber y, seguidamente, se adhieren a la superficie ósea mineralizada por el ribete en cepillo sellando los bordes del área mediante las integrinas. La integrina del osteoclasto, particularmente $\alpha_v\beta_3$, reconoce la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) existente en el colágeno y otras proteínas de la matriz osteoide. A este nivel el pH es ácido, ya que secretan ácidos (H^+) generados por la anhidrasa carbónica II y enzimas proteolíticas como colagenasas, metaloproteasas, catepsina K, glucuronidasa, etc. , que van a originar la reabsorción del hueso mediante la solubilización de la matriz orgánica primero y de la mineral después³⁰.

Respecto a la osteoclastogénesis actualmente se sabe que los osteoblastos son fundamentales para la formación de osteoclastos. Así, el factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF) producido por los osteoblastos es requerido en las primeras fases de la osteoclastogénesis para la formación de células gigantes multinucleadas. Los conocimientos actuales acerca de la regulación de la osteoclastogénesis se basan en la existencia de 3 moléculas clave: OPG (osteoprotegerina, proteína sintetizada por osteoblastos y pre-osteoblastos), RANKL (ligando situado en la superficie de osteoblastos y pre-osteoblastos) y RANK (receptor del anterior situado en la membrana de osteoclastos y pre-osteoclastos). El RANKL (receptor activator of NF κ B ligand) antiguamente llamado ODF (osteoclast differentiation factor) es una citoquina transmembrana perteneciente a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF). La interacción entre RANKL y su receptor

RANK produce una activación de la diferenciación y de la actividad osteoclástica, aumentando la reabsorción. Asimismo, los efectos del RANKL tanto in vivo, como in vitro son inhibidos por la osteoprotegerina (OPG), proteína circulante producida por los osteoblastos y pre-osteoblastos perteneciente a la superfamilia de los receptores de TNF²⁶.

Cuando se unen OPG y RANKL se inhibe la unión de RANKL a RANK y se inhibe la diferenciación osteoclástica. Por ello OPG, RANK y RANKL son importantes reguladores de la osteoclastogénesis²⁵.

A.2. Matrices.

A.2.1. Orgánica.

Aproximadamente el 35% del peso del hueso corresponde a la matriz orgánica. El colágeno tipo I es el constituyente principal (aproximadamente el 90%), el restante 10% consiste de componentes no colágenos. Fue el creciente interés en el compartimento no-colágeno del hueso lo que lanzó la creciente disciplina de la ingeniería tisular y animó a las compañías de biotecnología a explotar el potencial terapéutico de las proteínas no colagénicas. Entre las proteínas no colágenas, las BMPs son las que atraen más atención por su potencial terapéutico. Hay un considerable número de factores no colágenos y compuestos con actividades conocidas o especuladas. ²¹

La estructura, expresión y regulación de las principales proteínas no colagénicas se han discutido en varias publicaciones. Un abordaje útil desarrollado por Robey para categorizar las proteínas no colágenas es dividir las en proteoglicanos y glicoproteínas. Los proteoglicanos están compuestos de glicosaminoglicanos (GAGs) unidos a proteínas por enlace covalente. Los GAGs consisten de unidades sulfatadas de carbohidratos como el condroitin sulfato, el dermatan sulfato, keratan sulfato, y heparin sulfato. Los proteoglicanos incluyen al versican, decorin, biglicanos, fibromodulina, osteoglicina y osteoadherina. Como ejemplos de glicoproteínas tenemos a la osteonectina, trombospondinas, fibronectina, vitronectina, fibrilina, osteopontina y sialoproteína ósea. Estas proteínas no colágenas pueden modular la adherencia celular y mediar en la calcificación de la matriz orgánica.²¹

La fase orgánica del hueso puede considerarse como una matriz extracelular sólida (ECM). Los roles funcionales de la ECM están integrados con sus componentes individuales: colágeno, moléculas no colágenas y sustancia base. Los proteoglicanos constituyen la base de la sustancia base (condroitin sulfato y ácido hialurónico). El colágeno incluye tipo fibrilar (tipos I, II, III, V y XI) y no fibrilar (IV).²¹

Las moléculas adhesivas y antiadhesivas juegan un rol importante en la interacción célula-ECM, un concepto definido como reciprocidad dinámica. La fibronectina, un proteoglicano de superficie celular, es la mayor molécula de adhesión ECM. Las células también se pueden unir a la ECM por medio de proteoglicanos. Otras moléculas de adhesión son vitronectina, laminina, tenascina, osteopontina, SPARC

(osteonectina), trombospondina y entactina (nidógeno). Hay una gran cantidad de información que debe determinarse sobre los factores de adhesión de la ECM. Muchas propiedades de esta familia de moléculas de adhesión han sido revisadas extensamente.³⁰

La ECM es una unidad integrada que proporciona una superficie sobre la que se pueden expresar los factores solubles, como las BMPs. La interacción entre los factores y la ECM (moléculas colágenas y no colágenas) puede alistar a los factores para su unión con los receptores de superficie, como las integrinas. Esto puede asegurar la liberación segura de factores de acuerdo a los requerimientos locales, una propiedad que puede tener aplicaciones terapéuticas. Los mecanismos del manejo homeostático de BMP -su almacenaje, protección, liberación e inactivación- envuelven a la ECM, las células y sus receptores. Comentarios adicionales sobre los receptores de BMP se harán en este capítulo más adelante.²⁵

La adherencia celular al sustrato ECM se conoce ahora como anclaje. El anclaje precipita cambios citoplasmáticos, generando una modificación del citoesqueleto (se altera la forma de la célula), anunciando la fase de diferenciación celular.²⁵

A.2.2. Inorgánica.

Finalmente, el componente mineral del hueso representa el 65% del peso óseo. Está formado por calcio, fosfato y carbonato (en proporciones de 10:6:1) en forma de pequeños cristales de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y, en menor proporción hay magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor. El plasma se encuentra sobresaturado de calcio y fósforo respecto a la hidroxiapatita, por lo que debe haber sustancias que inhiban la mineralización. Las proteínas con capacidad adhesiva favorecen la mineralización, mientras que los proteoglicanos, magnesio, ATP y pirofosfato la inhiben.²¹

B. MACROESTRUCTURA

En este punto la discusión se concentra en la microestructura del hueso con sus componentes de células y matrices. Antes de discutir sobre los factores solubles, se deben hacer algunos comentarios sobre la macroestructura. Los componentes microestructurales del hueso (células, moléculas y iones) están integrados en un hueso macroestructural cortical (compacto) o esponjoso (trabecular). La forma macroestructural, las propiedades funcionales (protección, locomoción) y las propiedades fisiológicas (respuesta a necesidades metabólicas como el balance de calcio) se han estudiado por mucho tiempo. Por esto hay poco beneficio en repetir lo que se ha detallado en libros de texto de histología, anatomía y fisiología. Sin embargo, para tener una idea completa se mencionan algunos puntos.²¹

B.1. Hueso Cortical.

Macroscópicamente el hueso cortical aparece denso y compacto. Constituye aproximadamente el 80% del esqueleto, formando las capas interna y externa de los huesos tubulares y las tablas interna y externa de los huesos planos así como las superficies interna y externa de los cuerpos vertebrales y estructuras pélvicas. El hueso cortical está diseñado para proteger órganos vitales, asegurar la locomoción por actividades musculares y promover la hematopoyesis. El sistema Haversiano (osteones) en el hueso cortical actúa como refuerzo contra las fuerzas biofuncionales asegurando una máxima resistencia a las cargas de compresión y torsión.²²

Un sistema haversiano consiste de 4 a 20 anillos circunferenciales dispuestos concéntricamente que poseen un canal central de 22 a 110 μm de diámetro (el canal haversiano) que contiene vasos sanguíneos, linfáticos y algunas veces nervios.

El diámetro promedio del sistema haversiano en humanos es de 200 μm . Cada anillo posee una población variable de osteocitos, los cuales se encuentran unidos entre sí y éstos a su vez están unidos a otros osteocitos de otros anillos a través de sus procesos citoplasmáticos que atraviesan los canalículos. Además, los canales de Volkmann penetran el hueso cortical en dirección oblicua, anastomosándose con el sistema haversiano, proporcionando canales linfático-vasculares para el intercambio metabólico y de factores solubles como las hormonas. La dependencia vascular del hueso se enfatiza por el rico entramado de vasos que penetran su

estructura, asegurando que ninguna célula se ubique a más de 300 μm de un vaso sanguíneo.²¹

Esta red asegura un intercambio mutuo (de señales moleculares que pueden activar las células) entre osteocitos y osteoblastos de endósteo y periosteo, facilitando y promoviendo las respuestas funcionales y fisiológicas.²¹

B.2.Hueso Trabecular

Interpuesto entre el hueso cortical se encuentra el hueso trabecular o esponjoso. Una red tridimensional de trabéculas es la característica de su estructura. En general, la orientación espacial de las trabéculas es al azar (isotrópica). En vista a sus características biofuncionales no se espera que resista las cargas. Ha sido diseñado para responder con rapidez a los requerimientos fisiológicos incrementando hasta en 20 veces el área de superficie y la densidad celular del hueso cortical cuando esto se requiere.²²

C. FACTORES SOLUBLES

Uno de los principales intereses que se enfoca en los factores solubles, es debido a su potencial terapéutico. Por lo que se sigue acumulando información sobre su hipotético rol fisiológico.²⁰

C.1. Proteínas Morfogénicas Oseas (BMP).

Neuhof (1917) y Huggins (1930) demostraron la osteogénesis heterotópica. Levander (1938) estableció: "la regeneración ósea se da como resultado de una sustancia formadora de hueso específica que activa el tejido mesenquimal no específico". Urist lo consideró un factor clave que provoca formación de hueso, y en 1965 descubrió el concepto de autoinducción. Derivó el término osteoinducción en 1971, un principio fundamental de regeneración ósea potenciado por la acción de BMP. Tomó 17 años más para que otro evento ocurriera: Wozney y colegas clonaron los genes de las BMPs.

Los investigadores han tardado muchos años en explicar el rol de las BMPs. Ahora se aclara que las proteínas dirigen el desarrollo embriológico de células, tejidos y órganos, además de realizar tareas cruciales en la fisiología post-fetal.²¹

2.2.3. REGENERACIÓN ÓSEA GUIADA

La Regeneración Ósea Guiada fue una secuencia lógica y natural de los principios creados para la Regeneración Tisular Guiada (RTG), conseguida con el objetivo de complementar la terapia periodontal reconstruyendo los efectos causados por la enfermedad periodontal en el aparato de sustentación del diente.

La RTG tuvo resultados positivos que aprobaron la técnica cuando fue estudiada en animales. Los estudios clínicos en humanos confirmaron los resultados obtenidos en animales y su uso en Periodoncia pasó a ser rutina en aquellos casos en los cuales

estaba indicada la técnica. El suceso de esta técnica, basado en la promoción de nuevo ligamento periodontal y lógicamente de cemento y hueso, despertó la atención de los investigadores interesados en conseguir aumento de hueso en otras situaciones clínicas.²

Las células precursoras de osteoblastos están presentes tanto en los espacios medulares como en el endostio y periostio. Éstas, están localizadas frecuentemente en las inmediaciones de vasos sanguíneos próximos a la superficie ósea y son capaces de responder a la inducción osteogénica.⁷

Los osteoblastos no migran ni se dividen por lo cual dependen de células progenitoras (mesenquimatosas) localizadas en la superficie ósea adyacente para su formación y posterior formación de hueso. Una primera capa de osteoide es depositada y enseguida se mineraliza en secuencia similar al relleno de un alvéolo.⁷

Inmediatamente después de la extracción de un diente el alvéolo es ocupado por la hemorragia que en pocos minutos se transforma en coágulo. Mientras que en las primeras horas se observan residuos de alimentos y saliva en la entrada del alvéolo sobre el coágulo, en el centro del coágulo aparecen espacios rellenos con fluidos y a las 24 horas ya se observa fibrina y células tipo fibroblastos en la periferia del coágulo. En algunas áreas de la superficie ósea de las paredes del alvéolo se observan osteoblastos alineados mientras que los linfocitos y leucocitos inician la disolución del coágulo.⁶

Con 2 días de cicatrización se nota la sustitución del coágulo por tejido de granulación. Predominan fibroblastos y pequeños capilares al mismo tiempo que continúa la disolución del coágulo. ⁶

Al tercer día se observa intensa actividad celular cuando los capilares pueden ser vistos penetrando en el injerto debido a la angiogénesis. ⁶

El factor de crecimiento derivado de plaquetas estimula la mitosis celular del canal medular transferido junto con el injerto, y se inicia la angiogénesis del complejo capilar en su interior por la inducción de mitosis de células endoteliales. ²²

El factor de crecimiento transformante beta estimula la mitogénesis de preosteoblastos y osteoblastos para aumentar el número de estas células, así como promueve la diferenciación de las mismas en osteoblastos maduros y funcionales. Para sustentar la invaginación capilar, este factor de crecimiento influencia los osteoblastos y los fibroblastos a ingresar matriz ósea y colágeno respectivamente. ²²

El factor de crecimiento semejante a insulina a su vez actúa en osteoblastos endósticos que rodean las trabéculas del hueso esponjoso injertado. ²²

Esta evolución continúa observándose a los 4 días: una red de fibrina y tejido de granulación característico ocupan la periferia del alvéolo con una nítida y recién construida red de capilares. ⁶

Del 5° al 7° día a través de mecanismos de quimiotaxis, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (junto con la gradiente de oxígeno), atrae macrófagos al área injertada. A partir de ahí los procesos regenerativos serán estimulados por factores de crecimiento derivados de macrófagos. ⁶

La respuesta autocrina de auto estimulación se mantiene por las células del canal medular que continúan secretando factor de crecimiento transformante beta y factor de crecimiento semejante a insulina.

El aspecto del alvéolo después de una semana (en ratones) nos revela un relleno del 90% por tejido de granulación donde se encuentran vasos, fibroblastos y fibrillas colágenas recién sintetizadas. En este período, en la periferia de la abertura, se nota que la proliferación epitelial se extiende sobre el tejido de granulación, no obstante, por debajo del exudado y residuos de la superficie del coágulo que cierran la herida. Ya desde este momento, la proliferación epitelial caracteriza la importancia del uso de la membrana utilizada en RTG. ⁶

Un ejemplar de diez días de cicatrización muestra muchas trabéculas relativamente espesas y aglutinadas en el tercio apical del alvéolo quedando pocas áreas ocupadas por tejido conjuntivo, es decir, la formación ósea en el tercio apical comienza a ser compacta. En el tercio medio, las trabéculas son menos espesas y están más esparcidas, disminuyendo en grosor y cantidad conforme se van aproximando a la abertura del alvéolo donde el tejido conjuntivo promueve la cobertura de los tejidos jóvenes subyacentes.⁶

Después de dos semanas de la extracción, se observa que el tejido de granulación aún ocupa un área moderada del alvéolo con fibras colágenas más gruesas aumentando la red de conjuntivo y tejido osteoide. Al mismo tiempo, la migración epitelial continúa avanzando hasta cerrar la abertura del alvéolo, que se muestra con la mayor parte del área cubierta por hueso bien trabeculado envolviendo pequeñas áreas de conjuntivo remanente. Del tercio apical en sentido cervical aún se observa un área mayor con tejido conjuntivo que llega hasta la abertura del alvéolo. No obstante, el fondo del alvéolo, tanto en las paredes laterales como en la mayor parte del tercio medio, está ocupado por tejido óseo.⁶

El hecho que más se destaca a las tres semanas es la aparente formación ósea en la periferia del alvéolo, principalmente en la parte apical. No obstante, la parte más central del alvéolo y próxima a la abertura está ocupada por tejido conjuntivo joven mas bien fibroso y completamente cubierto por epitelio.⁶

La acción de los factores de crecimiento permite el mantenimiento de procesos cicatrizales, principalmente la mitogénesis de las células del canal medular y la angiogénesis capilar y cerca del 14° al 17° día se puede ver completa permeabilidad capilar del injerto.²²

Como estos capilares responden al gradiente de oxígeno luego que se difunden en el injerto, generan un mecanismo cesante para prevenir la plena superangiogénesis.

De la 4° a 6° semana se observa el injerto revascularizado y la regeneración ósea es casi completa; los macrófagos dejan el área iniciándose el proceso de reabsorción y reposición. Ocurre la liberación de Proteínas morfogenéticas y Factor de crecimiento semejante a insulina, proteínas ácido insolubles, que actúan en las células adyacentes del canal medular y preosteoblastos induciendo a la proliferación y diferenciación de estos en osteoblastos funcionales, que van a secretar matrices óseas.⁶

Este proceso definirá una arquitectura ósea madura con sistemas haversianos caracterizando al hueso de la Fase II con endostio y periostio, por lo tanto, autosustentado. De esta manera, a través de un ciclo normal de reabsorción, remodelación y progresión del injerto de un trasplante celular para un hueso maduro y funcional.²

A partir de este período, todos los tejidos continúan evolucionando, aumenta la cantidad de hueso desde la periferia en dirección al centro y desde el ápice hacia cervical, sin embargo, el conjuntivo que ocupa la parte la abertura del alvéolo ocupa también la parte central superior del mismo. ²

En conclusión, cuando el alvéolo complete su cicatrización habrá perdido considerable parte de la formación ósea porque además de la reabsorción que ocurre en la superficie del alvéolo, el conjuntivo formado ocupará la parte más coronal del alvéolo y parte del área central. ⁶

Si empleáramos los principios de RTG cubriendo el alvéolo con una membrana se lograría: disminuir la pérdida ósea por reabsorción en los márgenes del alvéolo, transformar en un área ocupada por tejido óseo aquella parte de tejido conjuntivo que se encuentra en la abertura del alvéolo y evitar que permanezca el área central con tejido conjuntivo; ésto debido a que el espacio proporcionado por la presencia de la membrana ciertamente sería ocupado por hueso. ²

Estos mismos principios fueron utilizados en las investigaciones donde se intentaba la formación ósea para mejorar las condiciones para colocar implantes, problemas estéticos y preparación para prótesis, denominando este proceso como Regeneración Ósea Guiada (ROG). ²

2.2.3.1 INDICACIONES Y TÉCNICAS QUIRÚRGICAS

Pocos años después del establecimiento de la Regeneración Tisular Guiada (RTG) por la Periodoncia, autores como Dahlin y Buser basados en los principios de esta técnica, desarrollaron el concepto de Regeneración ósea Guiada (ROG) donde fue empleado el proceso selectivo de células para obtener mejor formación ósea en diversos tipos de defectos óseos.

Paulatinamente las indicaciones se fueron expandiendo y la ROG hoy en día está indicada para regeneración ósea en alvéolos frescos, en diversas deformidades previamente establecidas en el reborde, para formar hueso alrededor de implantes recién instalados y para corrección de pérdidas óseas que ocurrieron durante o después de la oseointegración de implantes. ²

A. REGENERACIÓN DE ALVÉOLOS FRESCOS

El empleo de la ROG en alvéolos frescos tiene varias finalidades, siendo la principal la preservación del reborde para obtener mejores condiciones estéticas para la confección de prótesis fija o adhesiva e inclusive removible. Otras finalidades serían, pensando en el futuro, la colocación de implantes o la preparación del área para la colocación de implantes en una posición más favorable.

En términos de procedimiento quirúrgico se presentan 2 situaciones donde es necesario una pequeña variación en el acto quirúrgico: ²

B. ALVÉOLOS FRESCOS CON 4 PAREDES

En esta situación, el colgajo es generalmente de espesor total a no ser que exista la necesidad de fraccionarlo coronalmente, en cuyo caso la parte apical será de espesor parcial. Las incisiones relajantes biseladas siempre deben incluir un diente más a cada lado pues un buen acceso es fundamental. Realizamos la extracción de forma cuidadosa procurando hacer la luxación en sentido mesio-distal para no provocar reabsorción de la tabla ósea vestibular, enseguida removemos todo el tejido de granulación, activamos los espacios medulares que constituyen la reserva de células óseas y endoteliales mediante el raspado de la cortical ósea con cinceles o a través de pequeñas perforaciones con piedras esféricas e irrigamos Solución de tetraciclina en concentración de 50mg/ml. ²

En caso que el alvéolo tenga 4 paredes no es necesario el uso de materiales de relleno junto con la membrana pues Becker y cols. mostraron que en esta situación el injerto no trae beneficios y de hecho puede retardar la cicatrización. Por ello dejamos formar un buen coágulo y recubrimos con una membrana que puede ser no reabsorbible si existe riesgo de exposición de la misma o bien reabsorbible si este riesgo no existe. La membrana será colocada en forma de silla de montar sobre el reborde y se mantiene en posición por el colgajo suturado o también puede ser fijada al hueso a través de tachuelas o mini-tornillos. Enseguida suturamos el colgajo en la posición original o podemos traccionarlo coronalmente según la

necesidad de cada caso. Los cuidados pre y post-operatorios son los mismos descritos para la RTG. ¹⁰

C. ALVÉOLOS CON PÉRDIDA DE PAREDES

En esta situación el procedimiento quirúrgico es el mismo descrito anteriormente con la diferencia que usamos material de relleno antes de la colocación de la membrana. El material de preferencia es la hidroxiapatita reabsorbible de origen bovino, ésta tendrá la finalidad de evitar el colapso de la membrana al rellenar el alvéolo dado que estamos lidiando con alvéolos que han perdido por lo menos una pared ósea, generalmente la tabla ósea vestibular.

Además de esto, el material actúa como matriz para el desplazamiento y distribución uniforme de las células óseas y endoteliales por todo el defecto, de lo contrario éstas se depositarían en las paredes y avanzarían gradualmente en dirección al centro. Los demás pasos quirúrgicos son iguales a los descritos arriba y el tiempo de espera mínimo para finalizar la prótesis o colocar implantes es de 6 meses. ²

D. CORRECCIONES DE REBORDE

Son situaciones donde hubo reabsorción del reborde en sentido bucolingual/palatino y ocluso/apical debido a pérdida dentaria, más aún, esta pérdida no es uniforme por lo que el reborde es bastante irregular. La ROG tiene

potencial para regenerar el reborde perdido, dependiendo de su extensión. La extensión de la reabsorción depende del tiempo transcurrido desde la pérdida de los dientes y el motivo que llevó a ésta. Por ejemplo, dientes condenados debido a enfermedad periodontal avanzada están asociados a una gran destrucción ósea anterior a la pérdida de los dientes y por lo tanto la deformidad será mayor.

Actualmente es rutina que durante la evaluación de un paciente y la elaboración del plan de tratamiento se considere la preservación de los rebordes para la posterior colocación de implantes e inclusive para confeccionar prótesis más estéticas.

La ROG presenta un potencial mayor y más previsible para regenerar rebordes en sentido buco-lingual/palatino que en sentido ocluso-apical.

Nuevas técnicas están siendo desarrolladas para aumentar los rebordes en sentido ocluso-apical de forma más previsible, entre ellos el uso de bloques de hueso autógeno retirados de la cresta ilíaca o de regiones intraorales como el mentón. Éstas cirugías son de mayor envergadura y con peor post-operatorio que cuando se utiliza la ROG con injertos particulados y membranas. Además de estas técnicas han surgido grandes perspectivas con el empleo de factores de crecimiento óseo y técnicas recientes como la osteogénesis por distracción, las cuales aún se encuentran en estudio.

La técnica quirúrgica se resume en un buen acceso a través de colgajos de espesor total a veces asociados a colgajos de espesor parcial cuando hay necesidad de desplazarlos coronalmente. Se debe remover cualquier adherencia de tejido blando, descorticar para exponer los espacios medulares y estimular las células de su interior a través de desgastes superficiales con instrumentos rotatorios o pequeñas perforaciones con piedras especiales.

Se aplica material de relleno y se cubre todo con una membrana no reabsorbible o reabsorbible dependiendo del riesgo de exposición, se fijan las membranas por debajo del colgajo mediante el empleo de tachuelas o mini-tornillos y se sutura. El post-operatorio es igual para los casos anteriores y el tiempo de espera para la colocación de implantes es mínimo de 6 meses.^{2, 33}

2.2.4. USO DE MEMBRANAS EN REGENERACION OSEA GUIADA

Desde los primeros experimentos sobre la nueva inserción periodontal, la presencia de epitelio de unión y de la bolsa, se han percibido como una barrera para la terapéutica exitosa. Esto se afirma con base en que la presencia de epitelio interferiría con la aposición directa del tejido conectivo y cemento, y por lo tanto limitaría la altura a la cual podrían insertarse las fibras periodontales en el cemento.¹⁸

Se ha desarrollado una propuesta para evitar la migración epitelial, y consiste en colocar barreras de diferentes tipos que cubran al hueso y superficie radicular del tejido conectivo gingival y epitelio, esto creará un espacio entre la raíz y el tejido blando y logrará que las células del ligamento periodontal puedan migrar a lo largo de la superficie radicular para lograr nueva inserción. Este método se denomina «regeneración tisular guiada».³

Estudios de la cicatrización periodontal han dado como resultado el desarrollo de un tratamiento conocido como «regeneración tisular guiada», basado en el principio biológico de guiar la proliferación de varios componentes de los tejidos periodontales, durante la cicatrización, posterior a la cirugía periodontal. La regeneración tisular guiada implica la colocación de una barrera que cubra el defecto periodontal del tejido gingival (epitelio y tejido conectivo), para evitar el contacto con la superficie radicular durante la cicatrización. Durante este tiempo el espacio formado entre la barrera y la raíz, permite a las células del ligamento periodontal, producir nuevo tejido conectivo de inserción y células óseas para producir nuevo hueso.³

A finales de los 80, Dahlin utiliza ese mismo concepto de regeneración utilizando membranas en defectos óseos propiciados por extracciones dentales. Este concepto es llamado regeneración ósea guiada (ROG). Esta nueva terapia periodontal cumple con los objetivos de aumentar o regenerar deficiencias del proceso alveolar;

regeneración ósea alrededor de implantes colocados inmediatamente o reparar los defectos óseos asociados con implantes fracasados.¹

2.2.4.1. CARACTERISTICAS DE LAS MEMBRANAS UTILIZADAS PARA REGENERACION.

Existen también ciertas características que las membranas deben cumplir para poder lograr ROG:

1. Ser constituida con materiales biocompatibles
2. Poseer propiedades oclusivas para evitar que el tejido conectivo fibroso ingrese al espacio cubierto por la membrana, al mismo tiempo que proteja a la herida contra una invasión bacteriana si se llega a exponer la membrana.
3. Ser capaz de proveer un espacio suficiente en el cual el tejido óseo neoformado pueda crecer y la regeneración se pueda dar.
4. Tener capacidad de integración con los tejidos vecinos para lograr una integración tisular adecuada que permita facilitar la regeneración.

5. Ser clínicamente manejable.¹

2.2.4.2. TIPOS DE MEMBRANAS UTILIZADAS EN REGENERACIÓN

Existen actualmente dos tipos de membranas utilizadas para regeneración ósea guiada, membranas reabsorbibles y no reabsorbibles. Las membranas no reabsorbibles han sido utilizadas mayormente para este tratamiento y cuentan con una mayor investigación clínica.

Más recientemente un gran número de membranas reabsorbibles han sido introducidas y al parecer ofrecen ciertas ventajas sobre los materiales no reabsorbibles tradicionales.¹

A. MEMBRANAS NO REABSORBIBLES

A.1. ePTFE:

La primera membrana viable, especialmente diseñada para la regeneración tisular guiada y que también nos sirve para regeneración ósea guiada fue hecha de politetrafluoroetileno expandido. Esta membrana ha sido usada en numerosos estudios clínicos y en animales. La membrana consiste en dos partes contiguas. Un borde coronal o collar con una porción de microestructura abierta permitiendo que el tejido conectivo crezca dentro, diseñado para prevenir la migración apical del

epitelio. La parte remanente de la barrera es oclusiva, previniendo que el tejido gingival del exterior interfiera con el proceso de cicatrización de la superficie radicular. Las complicaciones que se pueden presentar son la exposición de la barrera y/o la formación de una bolsa, causando migración epitelial, es un hecho que puede haber contaminación por depósitos bacterianos, los cuales pueden tener un efecto determinante en la capacidad regenerativa de los tejidos periodontales.³

El ePTFE por ser un material no degradable, un segundo procedimiento quirúrgico es necesario para remover la membrana. Esto es un factor negativo, desde el punto de vista costo-beneficio y con respecto a un trauma quirúrgico adicional para el paciente y nuevamente regeneración de tejidos.³⁴

La remoción de la membrana ePTFE presenta un alto grado de dificultad debido a que su estructura porosa es incorporada al tejido.

Los filtros de policarbonato mostraron aumentar la reacción inflamatoria en comparación con ePTFE, lo que refleja la biocompatibilidad de esta membrana. La contaminación bacteriana puede también causar aumento en la reacción inflamatoria.³

B. MEMBRANAS REABSORBIBLES

Las membranas más comúnmente usadas en publicaciones científicas de regeneración tisular guiada han sido colágena, ácido poliglicólico, ácido poliláctico o copolímeros de estos materiales. Estas membranas también tienen la capacidad de ser usadas en ROG.³

B.1. COLÁGENA

El material más utilizado para la confección de barreras no reabsorbibles ha sido el politetrafluoroetileno expandido. Los resultados satisfactorios han sido una característica común e incuestionable de la innumerable cantidad de trabajos de experimentación y casos clínicos publicados al respecto. No obstante a esto, algunos autores sugieren la utilización de membranas reabsorbibles, argumentando la obtención de resultados igualmente predecibles sin requerir segundas cirugías de remoción.¹

Para realizar ROG es necesario contar con materiales que cumplan con los mismos requisitos de los que se exigen a los utilizados para RTG. A saber: 1. biocompatibilidad; 2. oclusividad celular; 3. generación de espacio; 4. integración a los tejidos y 5. fácil manipulación. Además, es necesario que permanezcan el tiempo suficiente como para permitir la proliferación de los tejidos buscados.³

Trabajos de laboratorio en los que se efectuaron defectos críticos en mandíbula de conejos, han demostrado que las membranas de colágeno son efectivas para evitar la invasión de tejido fibroso cuando se pretende ROG. Sin embargo, ante determinadas situaciones clínicas, estas membranas no resisten la presión que le ejercen los tejidos durante la cicatrización. Esto induce al colapso de la herida y por lo tanto al fracaso de la técnica. Es por esta razón que se aconseja su utilización en combinación con distintos tipos de injertos, con la intención de mantener dicho espacio.

La mayoría de las membranas de colágeno actualmente disponibles para RTG y ROG se obtienen del tejido cadavérico humano o animal. MO (Membracel Uso Odontológico) se ha desarrollado a partir de M, membrana de colágeno utilizada en medicina como cubierta temporaria para el tratamiento de quemaduras, escaras y úlceras varicosas.

Según datos aportados por el laboratorio, MO sería el producto de una alta purificación de tejido conectivo de animales jóvenes reconstituida en láminas, y estaría compuesta por colágeno tipo I y vestigios de ácido láctico y glicerol. Las características macroscópicas del material son su transparencia y su textura uniforme. Luego de ser humedecida por unos segundos en solución acuosa adquiere mayor resistencia y aumenta su maniabilidad.²³

B.2. ÁCIDO POLIGLÁCTICO

Barreras basadas en ácido poligláctico han sido viables para el uso periodontal en Suecia, demostrando resultados prometedores en animales. Recesión gingival, exposición de la barrera e inflamación del tejido blando son comúnmente encontrados clínicamente.⁸ La evaluación histológica después de cinco a seis semanas de cicatrización mostró migración epitelial alrededor de la barrera y el inicio de la desintegración de la barrera fue evidente.³

B.3. ÁCIDO POLILÁCTICO

Magnusson y cols. compararon el uso de ácido poliláctico con filtros en perros. La barrera reabsorbible resultó con mayor ganancia de inserción. En un estudio Pitrola y cols. evaluó histológicamente la respuesta de los materiales de las membranas de RTG, usando un modelo transcutáneo en la superficie dorsal en ratas. El material de ácido poliláctico fue bien tolerado y gradualmente absorbido.

Las barreras de co-polímeros de estos materiales no previenen la migración epitelial ni aumentan la inserción de tejido conectivo en raíces humanas con severa pérdida horizontal de hueso en enfermedad periodontal activa.³

B.4. POLIGLACTINA 910

Es una membrana compuesta de un material inerte sintético, que consiste de un co-polímero de glicólido y láctico a razón de 9:1. La reabsorción es llevada por hidrólisis del éster dentro de 60 a 90 días. Los resultados por el uso de esta membrana muestran nueva inserción de tejido, ganancia de inserción horizontal y vertical en defectos de furcación y una baja posibilidad de exposición de la membrana es encontrada con este material. Pocos defectos adversos fueron vistos en los sitios tratados.

Criterio adicional para la reabsorción. La reabsorción puede ser un punto positivo para la RTG, debido a que un segundo procedimiento quirúrgico es evitado.⁸ Pero se ha reportado, que por encima de la reabsorción, no es sólo un pre-requisito óptimo para una membrana de RTG.

Para una membrana biodegradable, demandas especiales deben ser sumadas al proceso de biorreabsorción, debe ser controlado para que el diseño de la membrana se mantenga durante el periodo inicial de la cicatrización y por un tiempo suficiente.

La reacción de inflamación local, así como una rápida degradación del material puede ser una consideración para la limitación del uso de estos materiales.³

2.2.5. PLACENTA

La placenta es un órgano efímero presente en la mayoría de los mamíferos y que relaciona estrechamente al bebé con su madre y atiende las necesidades de respiración, nutrición y excreción del feto durante su desarrollo. La placenta se desarrolla de las mismas células provenientes del espermatozoide y el óvulo que dieron desarrollo al feto y tiene dos componentes, una porción fetal, el corion frondoso y una porción materna o decidua basal.³⁵

2.2.5.1 CLASIFICACIÓN

La placenta humana es de tipo hemocorial (o discoidal), lo que quiere decir que el tejido fetal penetra el endometrio hasta el punto de estar en contacto con la sangre materna. Este tipo de placenta la presentan todos los primates y los roedores. Sin embargo, entre los mamíferos existen otros tipos de placenta³⁶:

Endoteliocorial: en la que el corion penetra en el endometrio, llegando a tocar los vasos de la madre. Es característica de animales carnívoros, como en el gato, el perro o el lobo.³⁷

Sindesmocorial: en ella el epitelio de la mucosa uterina sigue intacta, pero el trofoblasto llega a tener contacto con el tejido uterino permitiendo el paso de nutrientes necesarios. Existe en rumiantes como la oveja.³⁷

Epiteliocorial: el corion toca ligeramente el endometrio materno, pero no lo penetra, como es el caso en la cerda.³⁷

El tipo de placenta y el grosor de la membrana o barrera placentaria están muy relacionadas con el paso de sustancias de la madre al feto, así, existe una clara relación, inversamente proporcional al grosor de la placenta, en el paso transplacentario de ciertas sustancias. Esto se ha demostrado, por ejemplo, estudiando el paso de sodio a través de los distintos tipos de placenta, y observándose que el orden en la variación de este ión (de mayor a menor) sería: placenta hemocorial, placenta endoteliocorial, placenta sindesmocorial y placenta epiteliocorial. Cabe destacar, que en el ión estudiado (el sodio), la intensidad de los intercambios aumenta de manera casi regular a lo largo de la gestación, hasta un máximo, poco antes del alumbramiento. El descenso final en estos intercambios se atribuye en la placenta hemocorial a un depósito de fibrina sobre la superficie en la que se realizan los cambios.³⁸

2.2.5.2. ESTRUCTURA

La placenta humana comienza a formarse en la segunda semana de fecundación y se considera que ha adquirido su forma definitiva alrededor del tercer mes, cuando sigue extendiéndose, creciendo y engrosándose, pero ya está delimitada. Está formada por un componente materno (que es una transformación de la membrana uterina) y otra parte de origen fetal (trofoblasto), y su función es poner en relación de contigüidad la sangre de la madre y del feto.³⁹

A. COMPONENTE DE ORIGEN MATERNO

La placenta por la cara materna está formada por parte de la mucosa materna y dividida en lóbulos o cotiledones por una serie de surcos profundos. El origen de esta parte placentaria es la mucosa uterina, que en cada ciclo menstrual se prepara por la acción de una serie de hormonas ováricas (foliculina y progesterona) para la anidación. Esta proliferación del endometrio afecta a los vasos, al epitelio, al corion y a las glándulas. La anidación se suele realizar alrededor del día 21 (fase progesterónica, en la que predominan los fenómenos secretores más que la proliferación), momento que coincide con el máximo engrosamiento y vascularización de esta mucosa, que además contiene en estos momentos gran cantidad de glucógeno; todo esto hace que el blastocito encuentre las condiciones idóneas para implantarse y nutrirse.³⁸

Si no se produjese la anidación, el endometrio se descamaría y comenzaría a regenerarse (a partir del 4º día del ciclo) para una nueva posible implantación.

La porción materna es la parte más externa de la placenta, en contacto con la pared uterina, por lo que se llama placa basal. Consiste en tejido embriónico—el citotrofoblasto y el sincitiotrofoblasto (así como tejido materno) la decidua basal con los vasos y glándulas uterinas.⁴⁰

En la placenta se pueden distinguir entre 20 y 30 troncos vellosos (partes redondeadas y salientes por la cara materna). Cada uno de ellos con sus ramificaciones se encuentra suspendido en una cámara que está delimitada lateralmente por el septo intercotiledóneo que apareció en el cuarto mes de gestación.

B. COMPONENTE DE ORIGEN FETAL

Es una evolución del trofoblasto, el cual aparece alrededor del quinto día para que el huevo pueda implantarse el 6º o 7º día en la mucosa uterina. La implantación es posible gracias a que ésta parte no embrionaria del huevo tiene enzimas con actividad proteolítica, capaces de “romper” o lizar la parte del epitelio en la que tiene que implantarse, y gracias a ello, iniciar las relaciones materno-fetales. Está formado por dos partes, una capa celular interna (citotrofoblasto) y una capa celular externa (sincitiotrofoblasto). Estas capas están separadas del amnios por un

espacio de estroma extraembrionario. Todos estos componentes (el cito y sincitiotrofoblasto, el estroma extraembrionario y el amnios) lleva el nombre de placa coriónica.⁴⁰

Las evoluciones de está parte las podemos resumir en:

Hacia la séptima semana, el trofoblasto ha crecido y hay vellosidades visibles por todo el contorno.

Hacia el final del segundo mes, las vellosidades se agrupan para formar lo que se conoce como "corion velloso"

A los dos meses y medio comienza la refracción de las vellosidades en uno de los polos.

A los tres meses hay una individualización de la placenta: las vellosidades se agrupan en un polo (formando la placenta), y el resto está rodeado por corion liso, que permite vislumbrar el feto.

Después del cuarto mes se forma la decidua por transformación epitelial del estroma del endometrio en el sitio de la implantación y acumulación de lípidos y glucógeno.⁴⁰

Al final de la gestación, la placenta es un disco con un diámetro aproximado de 20cm y medio kilogramo de peso (que equivale aproximadamente al 16% del peso fetal). Una modificación excesiva de estos valores supone una patología. Por la cara fetal, y debido a la transparencia del amnios, se ve la distribución de los vasos umbilicales y, en algunas ocasiones, un recuerdo de lo que fue la vesícula umbilical en la base del cordón (de un máximo de 5mm).

La placenta humana es, por tanto, de tipo vellosa, hemocorial y corialantoidea, ya que las vellosidades placentarias se bañan de sangre materna y está recorrida por vasos cuyo origen es la circulación alantoidea fetal.³⁸

2.2.5.3. FUNCIONES

A. PRODUCCION HORMONAL

Hacia el final del cuarto mes, la placenta empieza su producción de progesterona como reemplazo en primera instancia del Cuerpo Lúteo, que como consecuencia este degenera al ser reemplazada su función por la placenta. Además de la progesterona, la placenta produce estrógenos, sobre todo el estriol, que en la vida uterina contribuyen al crecimiento del útero y de glándulas mamarias.

Del mismo modo es conocida por todos la amplia gama de sustancias que posee la placenta y sus funciones a saber; gonadotropina coránica, estrógenos y progesterona, somatotropina coriónica humana o lactógeno placentario, tirotropina coriónica humana, prolactina coriónica humana.

Más aún, de producir las hormonas requeridas para el embarazo, fabrica sustancias para las defensas inmunológicas y protege al bebé de numerosos contaminantes y patógenos. Debido a que cada embarazo se desarrolla de forma diferente, cada placenta opera de forma individual. ⁴¹

B. REGULACIÓN DEL TRANSPORTE HIDROELECTROLÍTICO

Esta es una propiedad que hace a la placenta y en especial a uno de sus componentes, como es la membrana amniótica altamente interesante en el tratamiento de los pacientes con quemaduras graves. Si bien es cierto la placenta es un tejido metabólicamente muy activo que regula la composición del líquido amniótico y produce gran variedad de sustancias químicas muy activas y de características endocrinas entre los cuales tenemos a las hormonas, factores de crecimiento y citoquinas. ⁴¹

C. ESCASA INMUNOGENICIDAD

De las dos partes en que se dividen las membranas fetales (amnios y corion) es conocido que la membrana amniótica se forma a partir del ectodermo fetal, por lo que un embarazo en realidad vendría a ser un injerto. Entonces el cómo es posible que un feto llegue a término sin ser rechazado es realmente difícil de comprender y puede obedecer a dos factores. Por una parte se ha podido constatar un cierto grado de inmunodepresión de la madre durante el embarazo, pero por otra en los tejidos fetales en contacto directo con los maternos apreciamos la falta de presencia de vasos sanguíneos y linfáticos y de determinados antígenos, ya que como se sabe la placenta representa una barrera hematológica entre la madre y el hijo, según la cual las sangres de ambos raras veces tienen un contacto directo, que son causados por microrupturas de la membrana placentaria, sino que el intercambio de nutrientes se da básicamente por difusión. Estas características que le permiten al feto llegar felizmente a término pueden ser las mismas que nos permitan utilizar la membrana amniótica en injertos sin la necesidad de otros procedimientos como la inmunosupresión del paciente.⁴¹

D. IMPIDE LA APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS EPITELIALES:

Estudios en diferentes órganos han demostrado que la presencia de una membrana basal o de una matriz extracelular es capaz de evitar la apoptosis de las células epiteliales rescatándolas hacia un nuevo ciclo celular.⁴²

E. PERMITE UNA ADECUADA REEPITELIZACIÓN

Si considerásemos a todas las propiedades que presenta la placenta, probablemente ésta sea la más importante y la que permite que su utilización sea hoy tan popular en Medicina. Varios autores utilizando muy diferentes membranas basales han llegado a la conclusión de que favorecen una más rápida epitelización. Y es que la membrana no es otra cosa que una capa de células epiteliales asentadas sobre un tejido constituido por sustancia fundamental es decir, matriz extracelular y membrana basal. A lo cual estudios realizados dentro del campo genético han constatado que la membrana amniótica expresa mRNA de gran número de factores de crecimiento (EGF, KGF, HGF y bFGF) que pueden favorecer la reepitalización tras su trasplante, tanto si lleva células como si no, aunque las cantidades de factores de crecimiento son significativamente mayores cuando el epitelio está adherido a la membrana, que sugiere un origen epitelial para estos factores de crecimiento.⁴¹

2.2.5.4. IMPLANTE DE MEMBRANA AMNIOTICA

La membrana amniótica es una membrana resistente, transparente, delgada y rica en colágeno que reviste la lámina coriónica y la placenta, en el período del desarrollo fetal, muy similar a la piel. Para su uso el amnios se separa de la lámina coriónica y de la placenta lo más pronto posible después del alumbramiento. El amnios es la capa más interna, ésta es lisa y brillante, su superficie externa está compuesta por tejido conectivo mesenquimal. El corión está unido a este tejido mesenquimal y está compuesto por células epiteliales. La membrana amniótica no

tiene conductos sanguíneos, conexiones nerviosas ni canales linfáticos. El grosor del amnios puede variar entre 0.02 a 0.4 mm y consta de cinco capas: epitelio, membrana basal, capa compacta, capa fibroblástica y capa esponjosa. Los resultados obtenidos con el implante de membranas amnióticas han propiciado su uso en las diferentes especialidades. Una de las barreras más importantes que se debe salvar es el riesgo de transmitir enfermedades infecto - contagiosas de donante a paciente.⁴²

A. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA ⁴²

1. Actúa como sello biológico
2. Prolonga la supervivencia y la capacidad de clonación de las células progenitoras
3. Promueve la diferenciación de las células epiteliales no calciforme
4. Promueve la diferenciación de las células epiteliales calciforme en presencia de fibroblastos Conjuntivales
5. Excluye células inflamatorias con propiedades anti proteasa

6. Suprime el sistema de señalización mediante TGF β y la diferenciación miofibroblástica de los fibroblastos normales.

7. Inhibe la angiogénesis

8. Produce efecto antimicrobiano

B. BASES MOLECULARES DE ACCIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA ^{43,44}

1. Baja antigenicidad (baja expresión antígenos complejo mayor de histocompatibilidad).

2. Secreción de factores de crecimiento epitelial: EGF, TGF- α , KGF, HGF, bFGF, TGF- β 1, - β 2, - β 3, KGFR y HGFR.

3. Aumento índice apoptosis células inflamatorias (P.M.N.).

4. Disminución factores de diferenciación miofibroblastos.

5. Inhibición proteasas.

6. Desestructuración DE genes codificadores de interleuquinas.

7. Sus lamininas favorecen el anclaje celular mediante hemidesmosomas

C. EXTRACCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA

Tanto la extracción de membrana amniótica como el proceso de conservación humana y su implante deben ser actividades a realizar por un equipo conocedor de los trasplantes y su manejo. La extracción programada se realiza en el curso de una cesárea para evitar la contaminación que puede afectar al tejido al pasar por el canal del parto.⁴⁵

Previamente se debe seleccionar una paciente que no presente ninguna patología (embarazo sin incidencias, sin incompatibilidad RH y con pruebas de screening serológicas negativas: VIH, Toxoplasma, VHB, VHC, VDRL y FTA) y se le ha informado del proceso lo que se reflejará con la firma de un consentimiento específico. Es fundamental la colaboración de la paciente seleccionada pues es necesario repetir a los 3 y 6 meses la serología para descartar casos en “período ventana” serológico.⁴⁵

El procesamiento del amnios se realiza en campana de flujo laminar VECO, modelo BIOSAFE 12 CL-II tipo A (clase 100) y consiste en una serie de lavados seguido de

limpieza, corte, empaque y radioesterilización. Paralelamente se realiza controles microbiológicos y aseguramiento de esterilidad.⁴²

Lavados: La secuencia es de dos lavados con: solución salina (10 minutos cada uno con agitación manual), se sigue con un lavado con solución de Hipoclorito de sodio 0,05%: por 30 minutos agitando manualmente y se termina con tres lavados con agua estéril: también por 10 minutos con agitación manual.⁴²

Limpieza: Se retira el corión del amnios. El corión es una capa gelatinosa que cubre la cara coriónica del amnios; esta capa es retirada cuidadosamente con una pinza.⁴²

Secado: Dentro de la campana de flujo laminar la membrana se extiende sobre tul estéril dejándola adherida a éste, cuidando poner la cara coriónica en sentido opuesto a esta tela, se deja secar toda la noche colgando de tal manera que evitamos la formación de arrugas, con el flujo laminar encendido.⁴²

Empaque: Una vez seco el amnios es cortado dentro de la campana de flujo laminar, en trozos aproximados de 5x3 cm con técnica estéril (junto con el tul), apartando los bordes irregulares. Esos bordes y los restos sobrantes se conservan para ser utilizados en los controles de calidad. Los trozos de amnios cortados se envasan, siempre en campana de flujo laminar, en un sobre plástico estéril

sellándolo térmicamente con doble sello. Sobre la cara superior de este envase se adhiere un rótulo incluyendo toda la identificación de ese tejido (nombre del tejido, código de identificación, fecha de vencimiento, cantidad y tamaño de las láminas y un indicador de irradiación). Sobre la cara posterior se adhiere otro rótulo con información respecto a la forma de uso del tejido y de las condiciones recomendadas para el almacenamiento. Cada envase es registrado en la hoja de procesamiento con el mismo código del envase y con la cantidad y tamaño de láminas contenidas en éste. Luego se agrega un segundo empaque plástico (bolsas para vacío con 90% de vacío). ⁴²

Irradiación: Los tejidos se irradian en su empaque final con dosis de 25 kGy, en un irradiador de Cs137 BPCDI con actividad de 35 mil Ci. ⁴²

Almacenamiento y cuarentena: los tejidos se almacenan a temperatura ambiente, protegidos de la luz y correctamente identificados, esperando el recontrol serológico de la donante el cual se efectúa a los 180 días post procuración. ⁴²

D. PROCESO DE LIOFILIZACIÓN

La liofilización es una modalidad de secado que consiste en la eliminación del agua por sublimación de la misma. Se debe trabajar a una presión y temperatura por debajo del punto triple. $T < 0,0099^{\circ}\text{C}$ y $P < 610,5 \text{ Pa}$, si en estas condiciones se aporta el calor latente de sublimación unos $2,84 \text{ MJ/kg}$ el hielo se transforma directamente en vapor.⁴⁷

El proceso de liofilización consta de tres partes:

1.- Congelación previa, se separa el agua de los componentes hidratados del producto, por la formación de cristales de hielo o mezclas eutécticas.⁴⁷

2.- Sublimación de estos cristales que elimina el agua del seno del producto trabajando a presión y temperatura por debajo del punto triple y aportando el calor latente de sublimación. Esta etapa tiene lugar en el liofilizador.⁴⁷

3.- Evaporación o desorción del agua que queda todavía adsorbida en el interior del producto. Es decir una vez sublimado todo el hielo, todavía queda cierta agua retenida en el alimento (agua enlazada) para ello se aumenta la temperatura del

liofilizador manteniendo el vacío lo cual favorece su evaporación, o bien el producto es llevado a un secadero.⁴⁷

2.2.5.5. Implante de placenta

A. LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La colocación de la placenta en el tejido celular subcutáneo permite la liberación permanente del producto placentario de tal forma que podemos considerarla una aguja química permanente que mantiene constante la actividad energética funcional de los circuitos acupunturales, a manera de una pila energética. Y es que esta propiedad está relacionada al conjunto de sustancia químicas presentes en la placenta.⁴¹

El procedimiento consiste en la aplicación de los implantes en la zona del bajo vientre con una técnica quirúrgica habitual, verificándose que en el transcurso de un mes los pacientes comienzan a reaccionar de manera favorable al estímulo del implante al llevar un control diario de su tensión arterial con lo que los estudios, afirman que podrá observarse que generalmente las cifras tensionales comienzan a disminuir. Si bien es cierto esto debe estar influido por la liberación de metabolitos placentarios hacia la circulación sistémica, y que probablemente estimularían la disminución de la tensión arterial.⁴¹

B. IRRIGACIÓN Y VASODILATACIÓN.

Las células de placenta dilatan a los vasos sanguíneos, producen una irrigación mejor a todo el organismo y facilitan así el trabajo tanto físico como intelectual, de tal manera que se contribuye a la regulación del medio interno y la homeostasis en general del cuerpo. Facilitando así la difusión y el intercambio de nutrientes, entre los capilares y los tejidos circundantes. Lo que consecuentemente contribuiría a un mejor desempeño histofisiológico del cuerpo humano. ⁴¹

C. IMPLANTE SUBDÉRMICO DE PLACENTA Y EL CONTROL METABÓLICO

Los implantes actúan facilitando la utilización de la glucosa, a nivel de los receptores de insulina en tejidos de órganos blandos, en los transportadores de glucosa sensible a la insulina así como, en la acción de los mismos en la esterificación de ácidos grasos y lipasa sensible a hormonas. ⁴¹

El tiempo efectivo del tratamiento es de un año. La placenta es la línea vital de transporte de nutrientes para el bebé antes de nacer.

D. REPARACION CELULAR Y CICATRIZACION

Puesto que permite una adecuada reepitalización, la placenta contribuiría en gran medida ayudando a los mecanismos naturales de reparación y renovación de

la piel, en ese sentido afirmamos; que estimula la formación de fibroblastos, especialmente de estas células que se encuentran en el tejido conectivo, la formación del colágeno y la elastina, son estos componentes fibrilares de la piel que la hacen suave y tersa, disminuyendo la aparición de arrugas. De igual manera mejoran la reparación celular por lo que son muy útiles en la cicatrización, también se les ha usado para tratamiento coadyuvante en la artritis, la osteoporosis, las cicatrices queloides, y se les ha utilizado para padecimientos auto inmunes como la esclerodermia. ⁴¹

E. MEDICINA ESTÉTICA

En medicina estética se utiliza para quitar arrugas, y junto con otros productos activos, revitalizar la piel en forma más fisiológica. Estudios revelan resultados muy satisfactorios siempre que después de una aplicación persistente durante largo tiempo se siga un tratamiento de mantenimiento por vía oral junto a un plan nutricional adecuado. ⁴¹

2.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál será el efecto de la membrana amniótica liofilizada como barrera en el proceso de regeneración ósea guiada de los defectos producidos en la tibia de conejos?

2.4 JUSTIFICACIÓN

En el terreno de la Periodoncia y de la Cirugía Oral y Maxilofacial a menudo nos encontramos con defectos óseos provocados por diferentes causas, los cuales constituyen un reto terapéutico debido a que precisan una reconstrucción que garantice un adecuado resultado estético y funcional.

La regeneración ósea guiada (ROG) se fundamenta en la utilización de sistemas barrera mediante membranas que aíslan un determinado defecto óseo, con la intención de evitar el crecimiento de tejidos con capacidad de reparación rápida, como el tejido conectivo, que interfieren con el potencial osteogénico del defecto.⁴

Existen en el mercado gran cantidad de buenos materiales con este fin, pero es claro que estos materiales disponibles para membranas no son iguales en términos de su efecto biológico, respuesta del huésped y resultados clínicos.

El mejor material que encontramos para regeneración ósea es el PTFE, la cual es una membrana que se encuentra dentro del grupo de las no reabsorbibles, así mismo también tenemos membranas reabsorbibles como las de colágeno o las de polímeros reabsorbibles (ácido poliglicólico o ácido poliláctico).

Hasta la actualidad solo se han tratado de mejorar estas membranas tratando de agregarles componentes como láminas de titanio para darles una mejor estabilidad, pero no se está tratando de desarrollar nuevos materiales para su uso como membranas o se está realizando muy poco. Por ello, es importante realizar más investigaciones en cuanto a nuevos materiales que nos puedan servir como barrera, como en este caso, el uso de la membrana amniótica como material para membranas en regeneración ósea guiada.

2.5 OBJETIVOS

2.5.1. Objetivo general:

Determinar el efecto de la membrana amniótica liofilizada en el proceso de regeneración ósea guiada en los defectos producidos en la tibia de conejo.

2.5.2. Objetivos específicos:

- ? Determinar el efecto clínico producido por la membrana amniótica liofilizada como barrera en el proceso de regeneración ósea guiada en los defectos producidos en la tibia de conejo después de 6 semanas de cicatrización.
- ? Determinar el efecto histológico producido por la membrana amniótica liofilizada como barrera en el proceso de regeneración ósea guiada en los defectos producidos en la tibia de conejo después de 6 semanas de cicatrización.

- ? Determinar el efecto radiográfico por la membrana amniótica liofilizada como barrera en el proceso de regeneración ósea guiada en los defectos producidos en la tibia de conejo después de 6 semanas de cicatrización.

2.6 HIPÓTESIS

La utilización de la membrana amniótica liofilizada como barrera producirá efectos clínicos, histológicos y radiográficos positivos en la regeneración ósea en los defectos producidos en la tibia de conejo después de 6 semanas de cicatrización.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Tipo de investigación

EXPERIMENTAL: Se evaluó el efecto de la Membrana amniótica liofilizada como membrana en el proceso de regeneración ósea en los defectos producidos en la tibia de los animales de experimentación.

PROSPECTIVO: Los resultados del efecto de la Membrana amniótica liofilizada como barrera en el proceso de regeneración ósea guiada se han registrado a medida que ocurren en controles después de 6 semanas.

3.2 Población y muestra

10 Conejos raza Nueva Zelanda de 4 a 6 meses de edad aproximadamente, hembras y machos en buen estado de 2 - 2.5 Kg. de peso.

3.3 Operacionalización de variables

3.3.1. VARIABLE INDEPENDIENTE

Uso de la Membrana amniótica liofilizada

3.3.2. VARIABLE DEPENDIENTE

Efecto Clínico, histológico y radiográfico de la membrana amniótica liofilizada en el proceso de regeneración ósea guiada.

3.3.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	CONCEPTUALIZACIÓN	DIMENSION SUB VARIABLE	DEFINICION	SUB DIMENSIONES	INDICADOR	ESCALA	CATEGORIA
<p><i>VARIABLE INDEPENDIENTE</i></p> <p><i>Uso de la Membrana amniótica liofilizada -</i></p>	<p><i>Biomaterial obtenido del tratamiento de la placenta humana, mediante el proceso de liofilización, usado como barrera durante el proceso de regeneración ósea.</i></p>	----	----	-----	-----	NOMINAL	<p><i>Uso de la membrana amniótica liofilizada (grupo experimental)</i></p> <p><i>No uso de la membrana amniótica liofilizada (grupo control)</i></p>

<p><i>VARIABLE DEPENDIENTE</i></p> <p><i>Efecto de la membrana amniótica como barrera en el proceso de regeneración ósea.</i></p>	<p><i>Capacidad de la membrana amniótica como barrera de regeneración ósea de lograr un efecto positivo en el proceso de regeneración ósea después de 6 semanas de cicatrización.</i></p>	<p><i>Efecto clínico de la membrana amniótica liofilizada como barrera en el proceso de regeneración ósea de los defectos producidos en la tibia de los conejos después de 6 semanas de cicatrización.</i></p>	<p><i>Valoración descriptiva de la zona donde se colocó la membrana después de 6 semanas.</i></p>	<p><i>Reacción inflamatoria de nivel de tejidos blandos</i></p> <p><i>Infecciones o exudados</i></p> <p><i>Fracturas de la zona de trabajo</i></p>	<p><i>Modificación del Método utilizado por Helpe.⁴</i></p>	<p>NOMINAL</p>	<p><i>Presencia de reacción inflamatoria</i></p> <p><i>Ausencia de reacción inflamatoria</i></p> <p><i>Presencia de proceso infeccioso o exudados</i></p> <p><i>Ausencia de proceso infeccioso o exudado</i></p> <p><i>Presencia de fracturas</i></p> <p><i>Ausencia de fracturas</i></p>
---	---	--	---	--	--	-----------------------	---

				<p><i>Tejido Blando llenando el defecto</i></p> <p><i>Tejido óseo llenando el defecto</i></p>		<p>NOMINAL</p> <p>NOMINAL</p>	<p><i>Presencia de tejidos blandos llenando el defecto</i></p> <p><i>Ausencia de tejidos blandos llenando el defecto</i></p> <p><i>Presencia de tejido óseo llenando el defecto</i></p> <p><i>Ausencia de tejido óseo llenando el defecto</i></p>
			<i>Variación</i>				

		<i>Efecto radiográfico de la membrana amniótica liofilizada como barrera de regeneración ósea guiada de los defectos producidos en la tibia de los conejos después de 6 semanas de cicatrización</i>	<i>encontrada en la imagen radiográfica en relación al patrón de trabeculado después de 6 semanas de cicatrización.</i>		<i>Método utilizado por Taguchi A. y col.⁵</i>	NOMINAL	<i>No hay variación en el patrón de trabeculado.</i> <i>Variación positiva en el patrón de trabeculado óseo.</i> <i>Variación negativa en el patrón de trabeculado óseo</i>
--	--	--	---	--	---	---------	---

		<p><i>Efecto histopatológico de la membrana amniótica liofilizada como barrera de regeneración ósea guiada de los defectos producidos en la tibia de los conejos después de 6 semanas de cicatrización.</i></p>	<p><i>Efecto encontrado a nivel microscópico en relación al proceso de regeneración ósea después de 6 semanas de cicatrización</i></p>	<p><i>Grado de madurez ósea</i></p>	<p><i>Modificación del Método utilizado por Helple.⁴</i></p>	<p>NOMINAL</p>	<p><i>Presencia de células indiferenciadas</i></p> <p><i>Proliferación y diferenciación de células indiferenciadas</i></p> <p><i>Presencia de islotes aislados de hueso inmaduro</i></p> <p><i>Espículas óseas uniendo los islotes de hueso inmaduro</i></p> <p><i>Hueso maduro compacto</i></p>
--	--	---	--	-------------------------------------	---	----------------	--

				Continuidad del defecto - hueso normal		NOMINAL	Ausencia de formación ósea en el reborde del defecto. Escasa formación ósea. Moderada formación ósea (2/3 del defecto sin relleno) Elevada formación ósea (1/3 del defecto sin relleno) Relleno casi total del defecto (mayor 2/3) Continuidad del defecto
--	--	--	--	--	--	---------	---

							<i>con el hueso normal 100%.</i>
--	--	--	--	--	--	--	--------------------------------------

3.4 Materiales:

- ? 1 Microscopio de luz a campo de alto poder (40x)
- ? 1 Laptop Pentium Dual Core, con el sistema operativo Windows Vista con el programa SPSS versión 11.5.

a) PARA RECOLECCION DE LA MUESTRA

- ? 10 Conejos raza Nueva Zelanda (Fig. 1)
- ? 10 Membranas amnióticas liofilizadas (Fig. 2)

b) PARA EL MANEJO DE ANIMALES

- ? 10 Jaulas
- ? 20 jeringas con agujas de tuberculina
- ? Ketamina (Fig. 3)
- ? Xilacina (Fig.4)
- ? Alimento balanceado
- ? 4 Mesas de trabajo
- ? 1 caja de Guantes de látex para examen

c) INSTRUMENTAL

- ? 50 pares de guantes quirúrgicos
- ? 50 pares de mascarillas descartables

- ? 20 campos operatorios quirúrgicos
- ? Gasa estéril
- ? 20 espejos bucales planos N° 5
- ? 10 sondas periodontal calibrada
- ? 10 Pinzas para algodón
- ? 40 hojas de bisturí N° 15
- ? 10 mangos de bisturí N°4
- ? 10 legbras para cirugía periodontal
- ? 4 litros de solución salina
- ? 4 recipientes de vidrio

d) Vestimenta

- ? 3 trajes quirúrgicos verdes completos
- ? 03 mandiles blancos

e) Para el procesamiento de la muestra

- ? 01 Micrótopo
- ? 50 Laminas portaobjeto
- ? 50 Laminas cubreobjeto
- ? 01 Formol neutro al 10% (formalina al 10%+ sales de sulfato)
- ? 01 Alcohol corriente
- ? Formalina al 10%
- ? Sales de sulfato

- ? Carbonato de calcio.
- ? Alcohol etílico 70°
- ? Alcohol etílico 80°
- ? Xilol
- ? Parafina fundida
- ? Hematoxilina eosina
- ? Ácido nítrico 10% (1/2 litro)

e) Fotografía

- ? 01 cámara fotográfica Sony Cybert Shoot 8X

f) Otros

- ? 20 Fichas de Protocolo de evaluación
- ? Lapiceros.

C) Infraestructura

Se realizó en tres ambientes:

- ? Servicio de Cirugía Experimental del Centro médico Naval "CMST"
- ? Servicio de Laboratorio de Anatomía Patológica del Centro Médico Naval "CMST".
- ? Servicio de Radiología del Centro Médico Naval "CMST".

3.5 Métodos

3.5.1. Procedimientos y técnicas

A. ETAPA PRELIMINAR

- Se coordinó con los departamentos correspondientes del Centro Médico Naval “Cirujano Mayor Santiago Távara” para llevar a cabo la ejecución de la parte experimental del presente trabajo de investigación.
- El material en estudio fue obtenido del Banco de Tejidos del Instituto Nacional de Salud del Niño (INSN).
- Los animales usados en el estudio fueron obtenidos del Instituto Nacional de Salud a través de su Centro Nacional de Productos Biológicos (Fig. 5), los cuales fueron trasladados hasta las instalaciones del Centro de Cirugía Experimental del Centro Médico Naval “Cirujano Mayor Santiago Távara” (Fig.6).
- Los animales de experimentación fueron enjaulados en grupos de 5 animales de manera tradicional, los cuales fueron alimentados con comida tradicional de conejo (Conejina de Agribands Purina Perú S.A.) más agua.

- Los animales fueron dejados por 7 días desde su llegada en las instalaciones del Centro de Cirugía Experimental del Centro Médico Naval “Cirujano Mayor Santiago Távara” para el período de aclimatación a su nuevo ambiente.
- Después del período de aclimatación el protocolo quirúrgico fue iniciado, todo el procedimiento anestésico, los procedimientos quirúrgicos, los cuidados post operatorios y el sacrificio de los animales fueron supervisados por especialistas correspondientes de la institución (Centro Médico Naval “Cirujano Mayor Santiago Távara”), en condiciones de asepsia adecuadas.

B. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

- Después del periodo de aclimatación los animales fueron preparados para la implantación quirúrgica del material en estudio.
- Se retiró el agua y comida 12 horas antes de la intervención.
- Se procedió a realizar la depilación de la zona de trabajo (región tibial) (Fig. 7)

- La inducción anestésica se realizó por vía intramuscular (IM) con la administración de clorhidrato de ketamina (35 a 50 mg / kg) más clorhidrato de xilacina (5 a 10 mg / kg), el nivel de anestesia fue mantenido con ketamina IM (Fig.8). El fallecimiento y el mantenimiento de la anestesia fueron controlados mediante la pérdida del reflejo pupilar del ojo, ausencia o presencia de movimientos respiratorios y la relajación del músculo esquelético de la zona quirúrgica.

- Después de la anestesia, el sitio quirúrgico trabajado fue la región mas baja de las extremidades posteriores (tibia), se procedió a colocar anestesia local (Lidocaína 2%), se realizó una incisión de 7 cm en la superficie medial de la tibia, extendiéndonos hasta el periostio, luego se realizó al levantamiento del colgajo dejando el hueso expuesto (Fig.9). Se utilizó un sistema de fresas para preparación de cavidades para implantes cilíndricos de 4mm de diámetro (Fig.10 y 11), se procedió a colocar el material de investigación (Membrana amniótica liofilizada) para cubrir la entrada de los defectos (membranas de 1cm²) (Fig.12). En cada tibia tuvimos 2 sitios de osteotomía 1 sitio en cada tibia fue el control negativo, el sitio restante fue cubierto con el material de experimentación (Fig.13).

- Se procedió a suturar todos los planos, los más profundos con hilo reabsorbibles (catgut crómico 5 ceros) y los más superficiales con seda negra 3 ceros (Fig. 14).⁴

C. CUIDADOS POST OPERATORIOS:

- Todos los animales fueron objeto de un control diario en los primeros 7 días después de la cirugía para observar señales de angustia, tales como cambios en el apetito, en la apariencia física y la protección de la extremidad afectada, un régimen de xilacina 5mg/Kg, fue administrado como analgésico en los casos necesarios, así como la aplicación de Enrofloxacino 5% 2.5mg/Kg. ²⁴
- Se esperó un período de 6 semanas de cicatrización.
- Pasadas las 6 semanas, se procedió a sacrificar a los conejos con una dosis de 60 mg/kg de pentobarbital sódico. ⁴⁸

3.5.2. Recolección de datos

Se procedió a realizar la recolección de datos en la reentrada clínica según ficha de recolección N°1 (Anexo 1). Se tomó la radiografía pertinente para realizar el análisis radiográfico y registrarlo en la ficha N°2 (Anexo 2). Por último para el análisis histológico las muestras de las tibias fueron fijadas en formol al 10% durante 24 hrs (Fig.15). Posteriormente fueron sumergidas en ácido clorhídrico al 10% durante 2

semanas (Fig.16), y luego en ácido nítrico al 10% durante 1 semana para completar el proceso de descalcificación (Fig.17). A continuación, fueron lavadas con agua corriente, se deshidrataron con alcoholes graduales y fueron aclaradas con xilol para ser incluidas en parafina con un punto de fusión de 54 °C (Fig.18). Después se realizaron cortes utilizando el micrótopo por rotación con un grosor de 7 µm (Fig.19) y se tiñeron con la técnica de Hematoxilina- Eosina (H-E) (Fig. 20). Por último, se observaron al microscopio óptico para determinar el proceso de regeneración ósea, que fue registrado en la Ficha N°3 (Anexo 3).⁴⁸

A. Procesamiento de datos

Los datos que fueron obtenidos a través de las fichas de registros de información fueron codificados para un mejor procesamiento de los datos. Se utilizó el programa SPSS 11.5 para su estudio estadístico.

B. Análisis de resultados

Luego de ingresar los datos codificados en el programa SPSS 11.5 se realizaron los análisis estadísticos, correspondientes de las variables, requeridos para responder a los objetivos planteados en el estudio. Se elaboraron tablas de distribución, frecuencia y de contingencia.

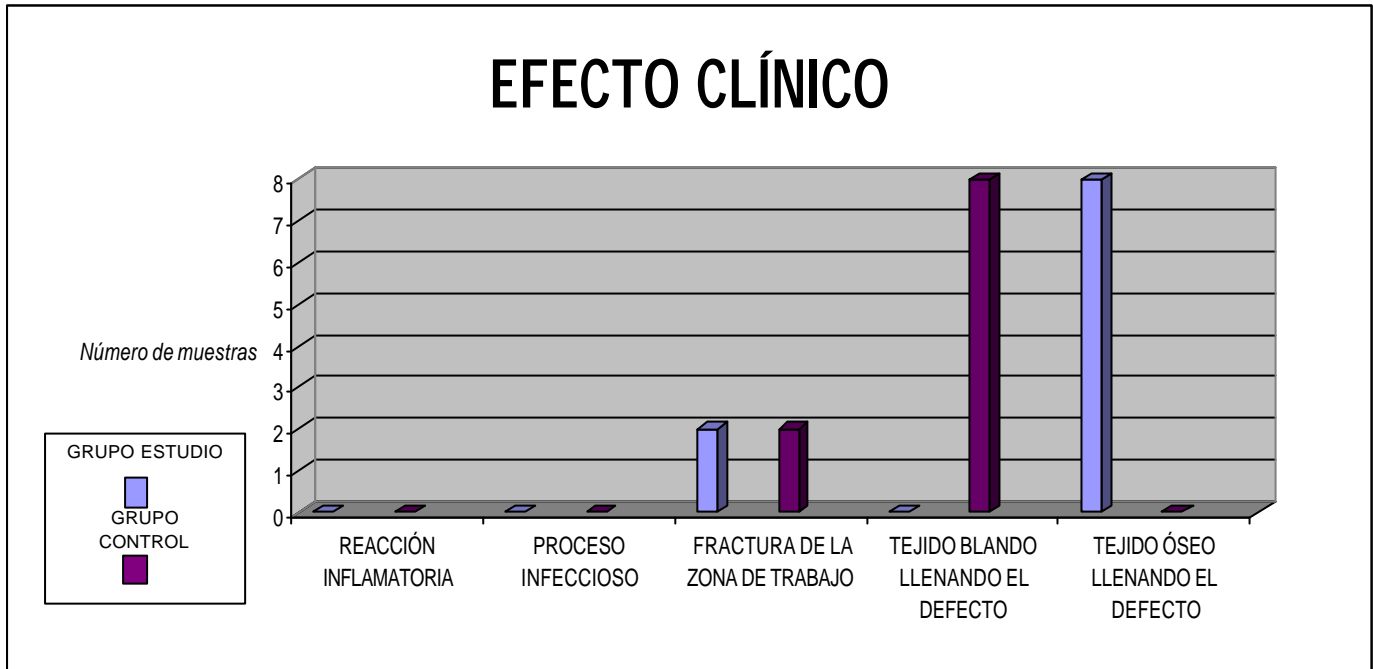
IV. RESULTADOS

CUADRO N° 1: Efecto clínico, después de 6 semanas de cicatrización, observado a nivel del área de estudio y área control

EFECTO CLÍNICO	GRUPO DE ESTUDIO				GRUPO CONTROL			
	AUSENCIA		PRESENCIA		AUSENCIA		PRESENCIA	
	n	%	n	%	n	%	n	%
REACCIÓN INFLAMATORIA	10	100%	0	0%	10	100%	0	0%
INFECCION	10	100%	0	0%	10	100%	0	0%
FRACTURA DE LA ZONA DE TRABAJO	8	80%	2	20%	8	80%	2	20%
TEJIDO BLANDO LLENANDO EL DEFECTO	8	80%	0	0%	0	0%	8	80%
TEJIDO ÓSEO LLENANDO EL DEFECTO	0	0%	8	80%	8	80%	0	0%

De un total de 20 muestras tanto las del grupo de estudio como las del grupo control, se observó clínicamente en todas ausencia de reacción inflamatoria (100%), así como ausencia de procesos infecciosos (100%), así mismo la presencia de tejido duro llenando el defecto en el 80% de las muestras del área de estudio, mientras que en el área control se observó clínicamente la presencia de tejido blando (tejido adiposo) llenando el defecto óseo en el 80% de las muestras. (Fig. 21)

GRÁFICO N° 1: Efecto clínico de la colocación de la membrana amniótica liofilizada

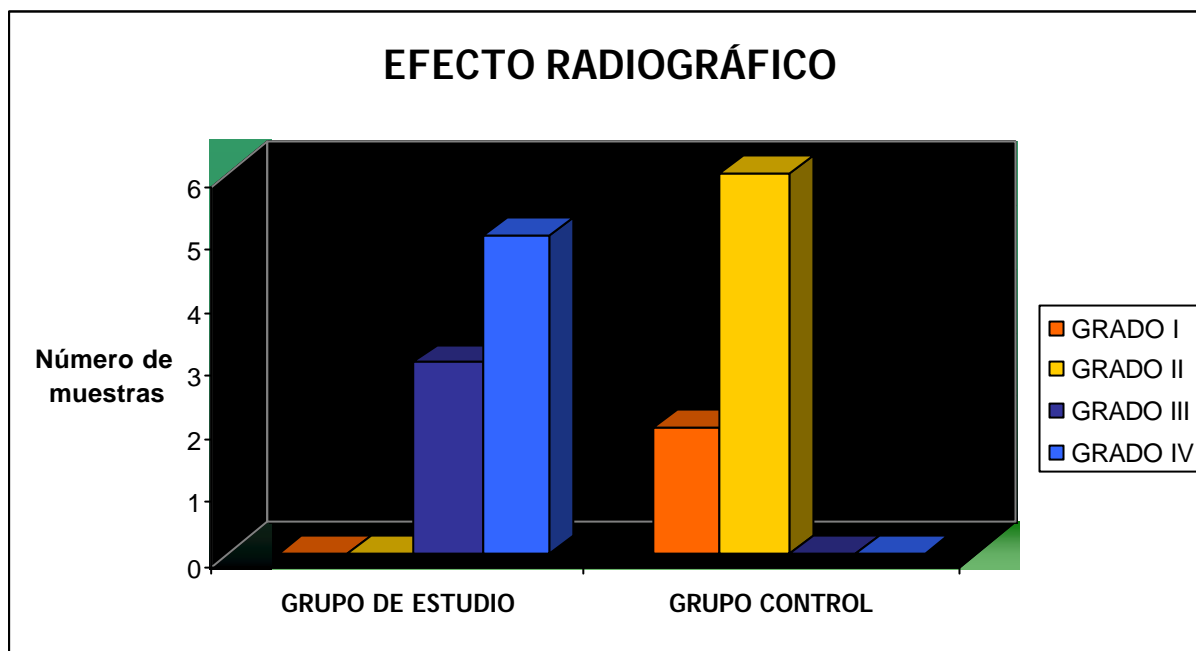


CUADRO N° 2: Efecto radiográfico, después de 6 semanas de cicatrización, observaciones según el patrón de trabeculado a nivel del área de estudio y área control.

VARIACIÓN EN EL TRABECULADO	GRUPO DE ESTUDIO		GRUPO CONTROL	
	N	%	n	%
GRADO I	0	0%	2	25%
GRADO II	0	0%	6	75%
GRADO III	3	37.5%	0	0%
GRADO IV	5	62.5%	0	0%
GRADO V	0	0%	0	0%
TOTAL	8	100%	8	100%

Después de tomar las radiografías pertinentes se clasificaron los resultados según los criterios utilizados por Taguchi A. y col⁵, se observó que el 62.5% de las muestras del grupo de estudio presentaron GRADO IV en relación al patrón del trabeculado, mientras que en el grupo control el 62.5% de las muestras presentaron GRADO II. (Fig.22)

GRÁFICO N° 2: Efecto radiográfico de la colocación de la membrana amniótica liofilizada según *Taguchi y col.*⁵

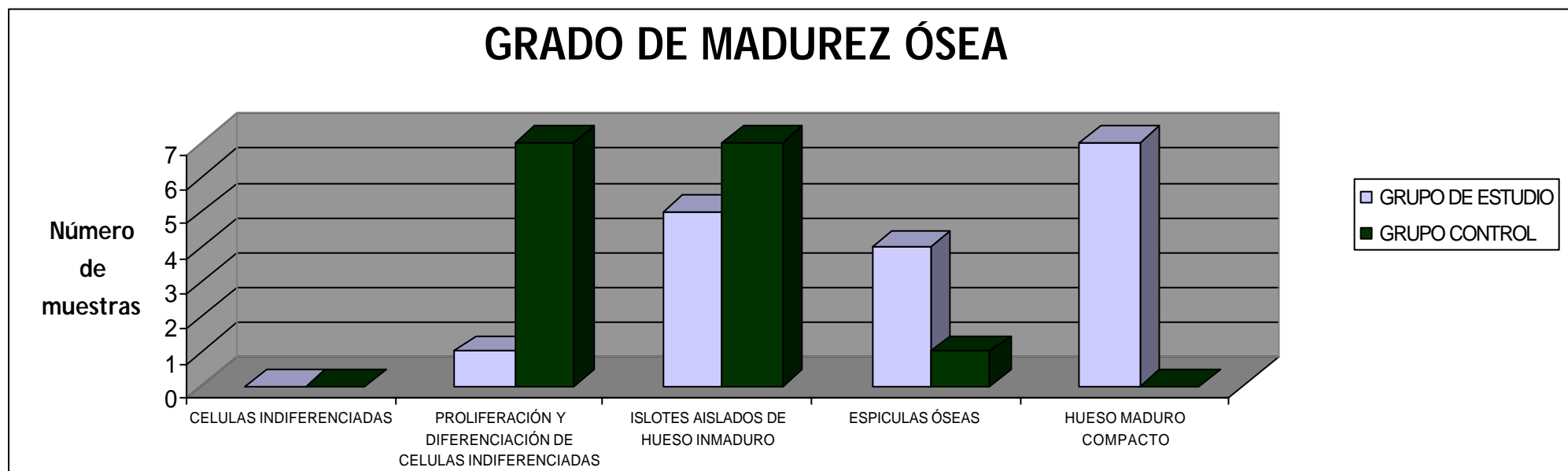


CUADRO N° 3: Efecto histológico, observaciones microscópicas después de 6 semanas de cicatrización, según el grado de madurez ósea.

GRADO DE MADUREZ ÓSEA	PRESENCIA				AUSENCIA			
	GRUPO DE ESTUDIO		GRUPO CONTROL		GRUPO DE ESTUDIO		GRUPO CONTROL	
	N	%	N	%	N	%	n	%
CELULAS INDIFERENCIADAS	0	0%	0	0%	8	100%	8	100%
PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CELULAS INDIFERENCIADAS	1	12.5%	7	87.5%	7	87.5%	1	12.5%
ISLOTES AISLADOS DE HUESO INMADURO	5	62.5.%	7	87.5%	3	37.5%	1	12.5%
ESPICULAS ÓSEAS UNIENDO ISLOTES DE HUESO INMADURO	4	50%	1	12.5%	4	50%	8	87.5%
HUESO MADURO COMPACTO	7	87.5%	0	0%	1	12.5%	8	100%

Con respecto a los resultados histológicos se observó que el 87.5% de las muestras del grupo de estudio mostraron presencia de hueso maduro compacto (Fig. 23), mientras que en el grupo control se reportó un 100% de ausencia del mismo. En el grupo control se observó como máximo grado de madurez ósea la presencia de islotes aislados de hueso inmaduro (Fig. 24) en un 87.5% de las muestras.

GRÁFICO N° 3: Efecto histológico de la membrana amniótica liofilizada en relación al grado de madurez ósea.

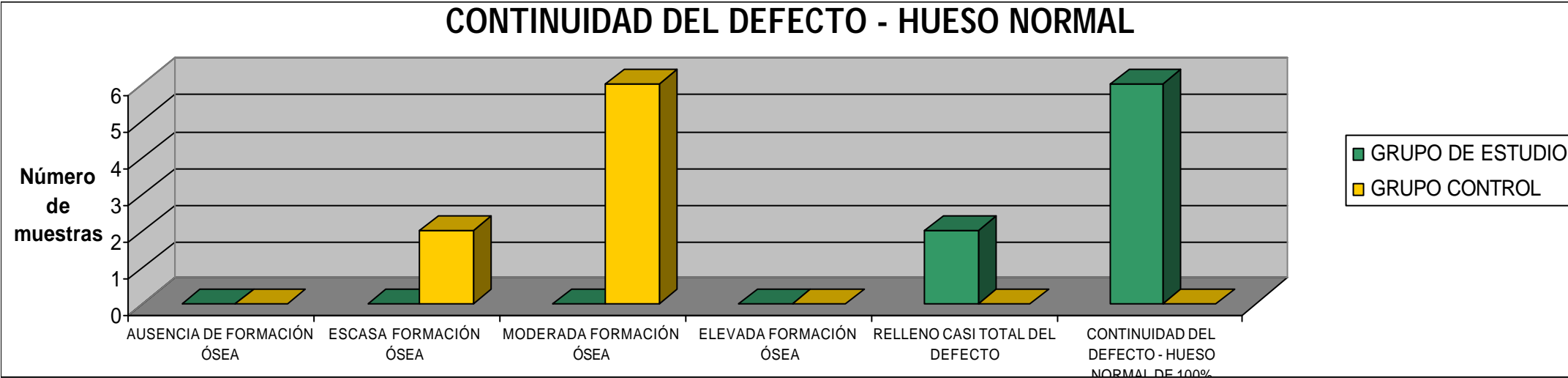


CUADRO N° 4: Efecto histológico, observaciones microscópicas después de 6 semanas de cicatrización, según la continuidad del defecto con el hueso normal.

CONTINUIDAD DEL DEFECTO – HUESO NORMAL				
PRESENCIA	ZONA DE ESTUDIO		ZONA CONTROL	
	N	%	n	%
AUSENCIA DE FORMACIÓN ÓSEA	0	0%	0	0%
ESCASA FORMACIÓN ÓSEA	0	0%	2	25%
MODERADA FORMACIÓN ÓSEA (2/3 del defecto sin relleno)	0	0%	6	75%
ELEVADA FORMACIÓN ÓSEA (1/3 del defecto sin relleno)	0	0%	0	0%
RELLENO CASI TOTAL DEL DEFECTO (Mayor de 2/3 de relleno)	2	25%	0	0%
CONTINUIDAD DEL DEFECTO – HUESO NORMAL (100%)	6	75%	0	0%
TOTAL	8	100%	8	100%

Se observó con respecto a la “continuidad del defecto con el hueso normal” que en el grupo de estudio el 75% de las muestras alcanzó una continuidad completa del “defecto con el hueso normal” (Fig. 23), en comparación al grupo control en el que el 75% de las muestras alcanzó tan solo una “formación ósea moderada” (Fig.24).

GRÁFICO N° 4. Efecto histológico en lo referente a la continuidad del defecto - hueso normal



V. DISCUSIÓN

La Regeneración Ósea Guiada (ROG) se basa en la formación de nuevo hueso para el relleno de defectos óseos; comprende el uso de membranas con funciones de barrera aptas para evitar la infiltración, en la zona de reparación, de componentes celulares (células epiteliales y conjuntivas) distintos a células osteopromotoras.

En la presente investigación utilizamos la membrana amniótica liofilizada como barrera biológica en este proceso de regeneración ósea, el cual fue realizado en los defectos creados en el tejido óseo de la región más inferior de las extremidades posteriores de los conejos (tibia).

Se determinó el efecto de esta nueva membrana, realizando la valoración de la misma en el proceso de regeneración ósea guiada en tres niveles: a nivel clínico (realizando la valoración macroscópica de la zona donde se colocó la membrana después de 6 semanas de cicatrización), a nivel radiográfico (mediante la variación encontrada en la imagen radiográfica en relación al patrón de trabeculado después de 6 semanas de cicatrización) y a nivel histológico (mediante las observaciones microscópicas de las muestras obtenidas del proceso de regeneración ósea después de 6 semanas de cicatrización, para lo cual se tomaron en cuenta 2 criterios: la continuidad del defecto óseo - hueso normal y el grado de madurez ósea).

Con este fin se obtuvieron en total 20 muestras (10 del grupo de estudio y 10 del grupo control) las cuales fueron analizadas clínica, histológica y radiográficamente.

Para el análisis clínico se tomaron en cuenta los siguientes criterios: la reacción inflamatoria y proceso infeccioso, presentando un 100% de ausencia tanto en el grupo de estudio como en el grupo control. Otro criterio tomado en cuenta para este análisis clínico fue la formación de fractura la cual se hizo presente en el 20% de casos en ambos grupos. Finalmente la presencia de tejido duro llenando la zona del defecto óseo se presentó en 80% de casos del grupo de estudio, siendo estadísticamente significativo ($p < 0.05$), mientras que la presencia de tejido blando llenando la zona del defecto óseo se presentó en el 80% de casos del grupo control, siendo igualmente estadísticamente significativo ($P < 0.05$), según la prueba Chi- cuadrado.

Para el análisis radiográfico según el método utilizado por Taguchi y col⁵, el cual clasifica la calidad del tejido óseo según el patrón de trabeculado en GRADO I, II, III, IV y V (GRADO I imagen completamente radiolúcida, GRADO V imagen completamente radiopaca y GRADO III imagen con patrón de trabeculado mandibular normal), el grupo de estudio presentaron patrones GRADO III y IV (tomando en cuenta que la tibia de conejo presenta imágenes más radiopacas que la mandíbula debido a la gruesa cortical que posee), mientras que en el grupo control presentaron patrones GRADO I y II, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el grupo de estudio y control, según la prueba Chi - cuadrado.

Para el análisis histológico se tomaron en cuenta dos patrones según el método de Helple: el primer patrón fue el grado de madurez ósea, según este criterio en el grupo control mediante en las observaciones microscópicas se encontraron básicamente proliferación y diferenciación de células indiferenciadas e islotes aislados de hueso inmaduro (87.5%), mientras que en el grupo de estudio se encontró principalmente hueso maduro compacto (87.5%) y en la parte más superficial de las muestras se observó islotes aislados de hueso inmaduro (62.5%) y espículas óseas uniendo islotes de hueso inmaduro (50%), siendo ambas estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según

la prueba de Chi - cuadrado, el segundo patrón tomado en cuenta para este análisis fue la Continuidad del defecto óseo - hueso normal, en el cual según las observaciones microscópicas el grupo de estudio presentó principalmente una continuidad total del defecto - hueso normal, es decir el relleno del 100% del defecto (75%), mientras que en el grupo control se observó básicamente una formación moderada de hueso, es decir un relleno de un tercio del defecto (75%), siendo los resultados estadísticamente significativos ($p < 0.05$), de acuerdo a la prueba de Chi - cuadrado.

En referencia a trabajos anteriores aplicando los injertos de membrana amniótica como barrera en el proceso de regeneración ósea, éstos hasta la actualidad no existen o todavía no han sido dados a conocer a la comunidad científica. La mayoría de trabajos en los cuales se utiliza esta membrana amniótica liofilizada se pueden encontrar en el mundo de la oftalmología^{42,45,16}, ya sea que estén siendo utilizados en intervenciones quirúrgicas de reconstrucciones de la superficie ocular^{42, 45}, o en casos de intervenciones quirúrgicas de Pterigon ocular¹⁶ en los cuales se utiliza esta membrana como una barrera para evitar el paso de microorganismos y la vez facilitar la reepitelización de la zona de trabajo. En todos los casos intervenidos el uso de la membrana amniótica liofilizada se mostró como una técnica segura, ya que en ningún caso se encontraron complicaciones intra o post- operatorias, ni se observó un empeoramiento de la zona del trabajo. Así mismo los resultados obtenidos por los estudios se mostraron estables por un periodo amplio de seguimiento. Esto se puede explicar gracias a que ésta membrana amniótica proporciona una membrana basal la cual favorece la migración y la diferenciación celular^{42, 45} (en nuestro estudio podemos decir que favoreció la migración de células multipotenciales que posteriormente se diferenciaron en osteoblastos), reduce la inflamación de la zona por debajo de la membrana⁴² y actúa como sello biológico evitando el pase de diversas clases de microorganismos hacia la herida (en nuestro estudio evita que diversos tipos de tejidos, especialmente el epitelial y el conjuntivo, ingresen dentro del defecto óseo impidiendo de esta manera una regeneración completa.

Es así que con estos resultados estamos demostrando que la membrana amniótica liofilizada ha tenido un efecto positivo en el proceso de regeneración ósea guiada, con lo cual estaríamos ante un gran avance en el campo de los biomateriales puesto que este material es mucho más accesible, en términos económicos, que los materiales que actualmente se encuentran en el mercado. Por otro lado estamos utilizando un material que es producido en las instalaciones del banco de tejidos del Instituto Nacional de Salud del Niño, con lo cual estamos revalorizando la biotecnología peruana.

VI. CONCLUSIONES

- ? El empleo de la membrana amniótica liofilizada clínicamente no produjo ningún tipo de reacción de cuerpo extraño o reacción inflamatoria alguna, tanto en el grupo de estudio como en el grupo control; hubo ausencia absoluta de reacción inflamatoria a las 6 semanas de cicatrización.
- ? Clínicamente la presencia de esta membrana amniótica liofilizada produjo diferencias significativas en lo referente a la presencia o no de tejido óseo o tejido blando llenando la zona de los defectos óseos creados.
- ? El uso de la membrana amniótica liofilizada produjo resultados radiográficamente positivos con respecto al patrón de trabeculado óseo, presentando patrones GRADO III y IV las muestras del grupo de estudio, mientras que las del grupo control presento patrones GRADO I y II.
- ? La membrana amniótica liofilizada produjo cambios histológicamente positivos en comparación al grupo control, tanto en relación al grado de madurez ósea como a la continuidad del defecto óseo - hueso normal-

- ? El uso de la membrana amniótica liofilizada como barrera en el proceso de regeneración ósea guiada que se realizó en los defectos óseos creados en la tibia de los conejos mostró resultados clínicamente, radiográficamente e histológicamente positivos en comparación al grupo control en el cual no se colocó ningún tipo de barrera.

VII. RECOMENDACIONES

- ? Realizar mayores estudios con la membrana amniótica liofilizada en lo referente a las diversas propiedades y características de la misma, puesto que estos puntos aún no han sido investigados a cabalidad y sería un gran aporte al ámbito médico - odontológico.
- ? Realizar nuevas investigaciones para determinar el tiempo de reabsorción de la membrana amniótica liofilizada, puesto que al momento de hacer la reentrada clínica a las 6 semanas no se encontraron rastros de la misma.
- ? Realizar nuevas investigaciones con una membrana amniótica de mayor grosor para que así sea mucho más fácil su manejo durante la intervención quirúrgica y tal vez de esta manera podamos hacer que ésta se reabsorba en mayor tiempo para lograr una adecuada regeneración.
- ? Difundir más este nuevo producto biológico en el mundo de la odontología, puesto que este trabajo es uno de los pioneros en investigaciones con esta membrana amniótica liofilizada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LA ROSA GARZA M de, CEPEDA J. Regeneración ósea guiada de cara al año 2000, consideraciones clínicas y biológica. Revista ADM 2000. 57(4): 147 - 153.
2. BELEM NOVAES A. Cirugía Periodontal con finalidad protésica. 1ª Edición; Sao Paulo-Brasil, 2001. p. 119-131
3. ZERMEÑO IBARRA J, CEPEDA BRAVO J. Comparación entre membranas biodegradables y no degradables en la terapia de regeneración tisular guiada, Revista ADM 1999; 56(1): 39-43.
4. PERAL CAGIGAL B, REDONDO GONZÁLEZ LM, VERRIER HERNÁNDEZ A, SERRAT SOTO A, TORRES NIETO MA, VAQUERO PUERTA C. Estudio experimental sobre la regeneración ósea mandibular de la rata con diferentes biomateriales. Rev Esp Cirug Oral y Max 2008; 30 (1): 15 - 24
5. TAGUCHI A., TANIMOTO K., SUEI Y., OTANI K., WADAMOTO M., AKAGAWA Y., WADA T., ROHLIN M., Observer agreement in the assessment of mandibular trabecular bone pattern from panoramic radiographs. Dentomaxillofacial Radiology 1997; 26: 90-94

6. GRANDINI S.A.; BOOTH, D.F.; KILGORE, T.B. Wound healing following tooth extraction. Histological study in rats utilizing perfusion technique with carbon black suspension. Rev Fac Farm Odont Rib Preto 1975; 2 (1): 37 - 41
7. GOTTLOW J. et al. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. Journal Clinic of Periodontology 1984; 11: 494 - 503.
8. DAHLIN C. et al. Healing of bone defects with guided tissue regeneration. Plastical Reconstructive Surgery 1988. 81: 672 - 676.
9. DAHLIN C. et al. Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: An experimental study in rabbits. Int. J.Oral Maxillofac. Impl. 1989; 4: 19 - 25.
10. BECKER W. Clinical and histologic observations of sites implanted with intraroral autologous bone grafts or allografts. 15 human case reports. Journal of Periodontology 1996; 67 : 1025 - 1033.
11. SEIBERT AND NYMAN. Localized ridge augmentation in dogs. A pilot study using membranes and hydroxyapatite. Journal of Periodontology 1990; 61: 157 - 165.

12. KOSTOPOULOS AND KARRING . Augmentation of the rat mandible using guided tissue regeneration. Clinical oral Implantology and Restaurative 1994. 5 : 75 - 82 .
13. KOSTOPOULOS AND KARRING. Guided bone regeneration in mandibular defects in rats using a bioresorbable polymer. Clinical oral Implantology and Restaurative1994; 5 : 66 - 74
14. BUSER D, DULA K, HESS D, PETER H, HIRT & URS C BELSER. Localized ridge augmentation with autografts and barrier membranes, Periodontology 2000 1999, 19 : 151-163
15. NIKOLAOS D et al. Long-term stability of autogenous bone grafts following combined application with guided bone regeneration. Clin. Oral Impl. Res. 2005; 16: 133-139
16. STANGOIANNIS-DRUYA, MARTÍNEZ M., PAZ L.E., MÁRQUEZ K. Trasplante de membrana amniótica o Auto injerto conjuntival en Pterigi3n Nasal Recidivantes. Rev. Oftalmol. Venez. v.60 n.4 Caracas dic. 2004
17. VON ARX T, BUSER D. Horizontal ridge augmentation using autogenous block grafts and the guided bone regeneration technique with collagen membranes: a clinical study with 42 patients. Clin. Oral Impl. Res. 2006; 17: 359-366

18. MAJLUF I, HARÁN J, MORENO G. Regeneración ósea guiada utilizando membrana de óxido de aluminio en combinación con implantes oseointegrados. Rev Esp de Cirug Oral y Max 2007; 29(4) 45 - 57.
19. HAMMERLE C, JUNG R, YAMAN D, LANG P. Ridge augmentation by applying bioresorbable membranes and deproteinized bovine bone mineral: a report of twelve consecutive cases. Clin. Oral Impl. Res. 2008; 19: 19-25
20. LYNCH and GENCO. Basic principles of tissue engineering. Quintessence Publishing Co. 1999: 3- 15.
21. LYNCH and GENCO. Biology of bone healing: Its impact on clinical therapy. Quintessence Publishing Co. 1999: 17 - 50.
22. LYNCH and GENCO. Periodontal and Bone Regeneration in oral cavity. Quintessence Publishing Co. 1999: 17 - 50.
23. RIEDENSTEIN A. Precursor cells of mechanocytes. Int Rev Cytol 1976; 47 : 327-55.
24. CANFIELD A, DOHERTY M, ASHTON B. Osteogenic potential of vascular pericytes. JE ed. Bone Engineering 2000. 5: 143-51.

25. CIVITELLI R, BEYER E, WARLOW P, ROBERTSON A, GEIST S, STEINBERG T. Connexin 43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cells networks. *J Clin Invest* 1993; 91:88-96.
26. SIMONET W, LACEY D, DUNSTAN C, KELLEY M, CHANG M, LUETHY R ET AL. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density 1997; 89:09-19.
27. AUBIN J, LIU F. THE OSTEOLASTS LINEAGE. EN: BILEZIKIAN JP, RAISZ LG, RODAN GA, eds. *Principles of Bone Biology*. San Diego, California: Academic Press;1996. p. 51-67.
28. HAM AW. Some histophysiological problems peculiar to calcified tissue. *J Bone Joint Surg Am* 1952. p.34:701.
29. LANYON L. Osteocytes, strain detection, bone remodeling and remodeling. *Calcified Tissue Int* 1993;53:102-7.
30. MUNDY GR. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *J Bone Miner Res* 1993;8:505-10.
31. RESS TL, QIAN Y, KAUFMAN S, RING BD, VAN G, CAPPARELLI C et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol* 1999;145:527-38.

32. LACEY DL, TIMMS E, TAN HL, KELLEY MJ, DUNSTAN CR, BURGUESS TL et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclasts differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-76.
33. RAMOS y col. Regeneración ósea guiada con injerto autógeno de mentón. *Odontol. Sanmarquina* 2007; 10(2): 33-36
34. ORTIZ B. Y col. Colonización bacteriana de membranas de PTFE-e en regeneración tisular guiada, *Revista ADM* 2006; 63(4):135-141
35. CROSS JC. How to make a placenta: mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice--a review 2005; 26:3-9.
36. LEONARDO J. DE LUCA (Laboratorios Burnet). Aborto bovino. *Boletín informativo*. 2008. p. 12-18.
37. Estructura y fisiología de la placenta. *Boletín de la Escuela Universitaria Ingeniería Técnica Agrícola* 2007. p. 24-32
38. MERKIS, C. I.; CRISTOFOLINI, A. L.; FRANCHINO, M. A.; MOSCHETTI, E.; KONCURAT, M. A. Relación entre Área Total y Área Epitelial de vellosidades placentarias porcinas en diferentes estadios gestacionales. *InVet* 2005; 7: 15-21.

39. JAMES C. CROSS, LYNN ANSON-CARTWRIGHT AND IAN C. SCOTT. Transcription Factors Underlying the Development and Endocrine Functions of the Placenta. Recent Progress in Hormone Research 2002 ; 57:221-234
40. Universités de Fribourg, Lausanne et Berne (Suisse). Development of the placenta. 2004.p. 5-11.
41. FOGEL SILVA, BORIS ELTSIN. Revista de la Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Medicina, Escuela de Medicina Humana. 2008.p. 1-8.
42. AGUIRRE P., EU. OGRODNIK M. T., M.V. ZARATE H., ING. SILVA S., DR. AZOCAR M., DR. HITSCHFELD M. Use of amniotic membrane in ophthalmology surgery, first cases. Comisión Chilena de Energía Nuclear 2007;26: 1-8
43. TSENG SC, LI DQ, MA X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. J Cell Physiol 1999 Jun; 179(3): 325-335.
44. KURPAKUS MA, DANESHVAR C, DAVENPORT J, KIM A. HUMAN. Corneal epithelial cell adhesion to laminins. Curr Eye Res 1999 Aug; 19(2): 106-114.
45. RODRÍGUEZ MARTÍN J, DE BONIS REDONDO E, RODRÍGUEZ SANTANA A, GONZÁLEZ DE LA ROSA MA. Transplante de membrana amniótica en patología

de la superficie ocular. Hospital Clínico de San Carlos de Madrid, Revision de Casos. 2004.

46. BERNALES D. , CARIDE F, LEWIS A Y MARTIN L. Membranas de colágeno polimerizado: consideraciones sobre su uso en técnicas de regeneración tisular y ósea guiadas. Rev Cubana Invest Biomed 2004;23(2):65-74

47. WANG M, KHAN AM, GAREY CE. Deshidratación: secado y liofilizacion. Rev de Tecnologías de alimentos. 2007. p. 22-23-

48. EILL SR, COBB CM, RAPLEY JW, GLAROS AG, SPENCER P., In vivo comparison of synthetic osseous graft materials. A preliminary study. J Clin Periodontol 1999; 26: 239-245.

VI. ANEXOS

FICHAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

ANEXO 1

<i>EFEECTO CLÍNICO</i> <i>A las 6 semanas de cicatrización</i>	ÁREA DE CONTROL NEGATIVO		ÁREA DE ESTUDIO	
	PRESENCIA	AUSENCIA	PRESENCIA	AUSENCIA
REACCIÓN INFLAMATORIA A NIVEL DE TEJIDOS BLANDOS				
INFECCIONES O EXUDADOS				
FRACTURA DE LA ZONA DE TRABAJO				
TEJIDO BLANDO LLENANDO EL DEFECTO				
TEJIDO OSEO LLENANDO EL DEFECTO				

ANEXO 2

EFFECTO RADIOGRÁFICO

A las 6 semanas de cicatrización

VARIACIÓN EN EL TRABECULADO	ÁREA DE CONTROL NEGATIVO	ÁREA DE ESTUDIO
GRADO DE PATRÓN DE TRABECULADO (Método Utilizado por Taguchi y col ⁵)		

ANEXO 3

<i>EFEECTO HISTOPATOLOGICO</i> <i>A las 6 semanas de cicatrización</i>		ÁREA DE CONTROL NEGATIVO		ÁREA DE ESTUDIO	
		PRESENCIA	AUSENCIA	PRESENCIA	AUSENCIA
GRADO DE MADUREZ ÓSEA	<i>Células indiferenciadas</i>				
	<i>Proliferación y diferenciación de células indiferenciadas</i>				
	<i>Islotes aislados de hueso inmaduro</i>				
	<i>Espículas óseas uniendo los islotes de hueso inmaduro</i>				
	<i>Hueso maduro compacto</i>				
CONTINUIDAD DEL DEFECTO - HUESO NORMAL	<i>Ausencia de formación ósea en el reborde del defecto.</i>				
	<i>Escasa formación ósea.</i>				
	<i>Moderada formación ósea (2/3 del defecto sin relleno)</i>				
	<i>Elevada formación ósea (1/3 del defecto sin relleno)</i>				
	<i>Relleno casi total del defecto (mayor 2/3)</i>				
	<i>Continuidad del defecto con el hueso normal 100%.</i>				

FIGURAS



Fig.1. La población consistió en 10 conejos raza “Nueva Zelanda” de 2 a 2.5 Kg. de peso, los cuales fueron divididos en dos grupos de 5 unidades cada uno para un mejor manejo y control



Fig 2. El material de estudio fue la “Membrana amniótica liofilizada”, la cual fue obtenida del banco de tejidos del INSN



***Fig.3. Ketamina 100mg/ml
(Frasco de 30ml)***



***Fig.4. Xilacina 2%
(Frasco de 10 ml)***



***Fig.5. Instalaciones del
INSTITUTO NACIONAL
DE SALUD - Chorrillos***



Fig.6. INSTALACIONES DEL CENTRO DE CIRUGÍA EXPERIMENTAL del CEMENA “Cirujano Mayor Santiago Távara”



Fig.7. Depilación del área de trabajo, evitando así posibles focos de microorganismos, y al mismo tiempo logramos una mejor visualización de la zona de trabajo.



Fig.8. Inducción anestésica. Aplicación de ketamina y xilocaína vía endovenosa.

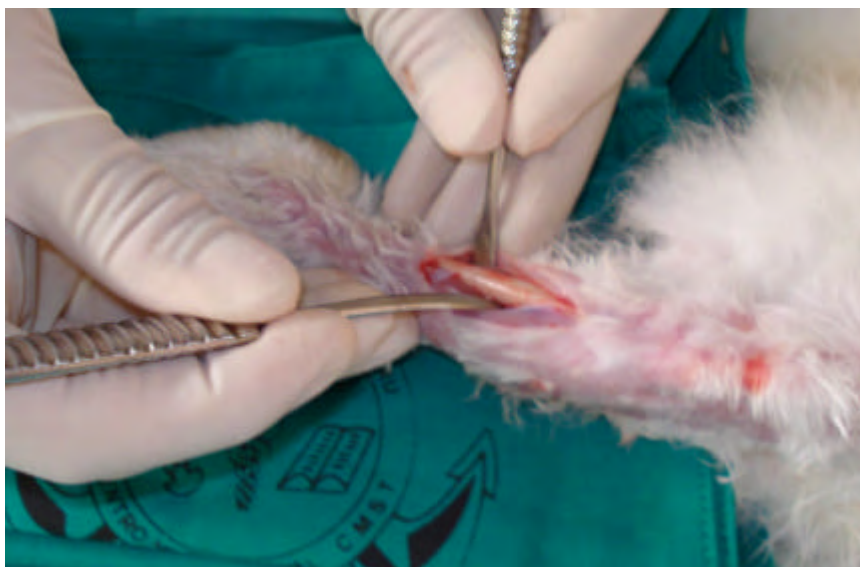


Fig.9. Incisión de 7 centímetros a nivel de la cara interna de la tibia, después de decolar todos los planos correspondientes nos queda el tejido óseo en el que vamos a trabajar.

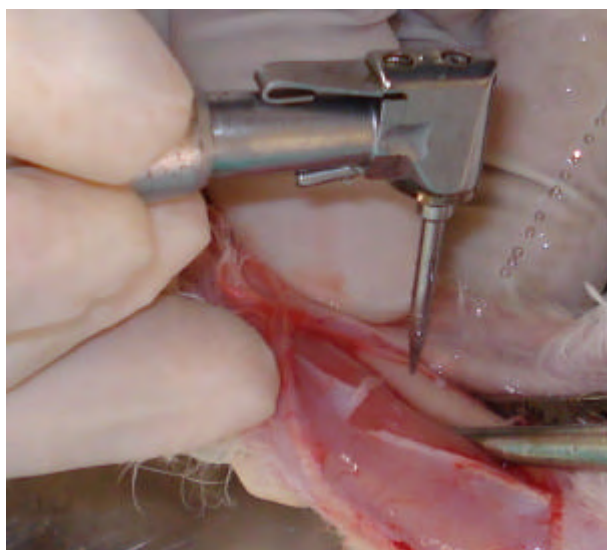


Fig.10. Para la creación del defecto se utilizó el mismo sistema de fresas que utilizamos para la colocación de implantes cilíndricos, con el mismo protocolo de trabajo

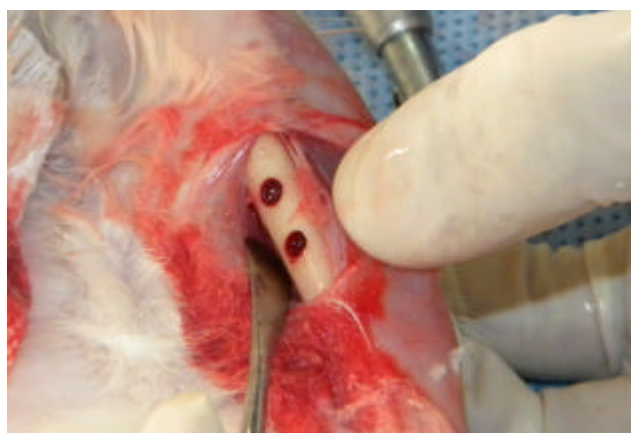


Fig.11. Defectos óseos de 4 mm de diámetro, en cada tibia se realizaron 2 perforaciones una para nos sirvió como área de estudio y la otra como área control

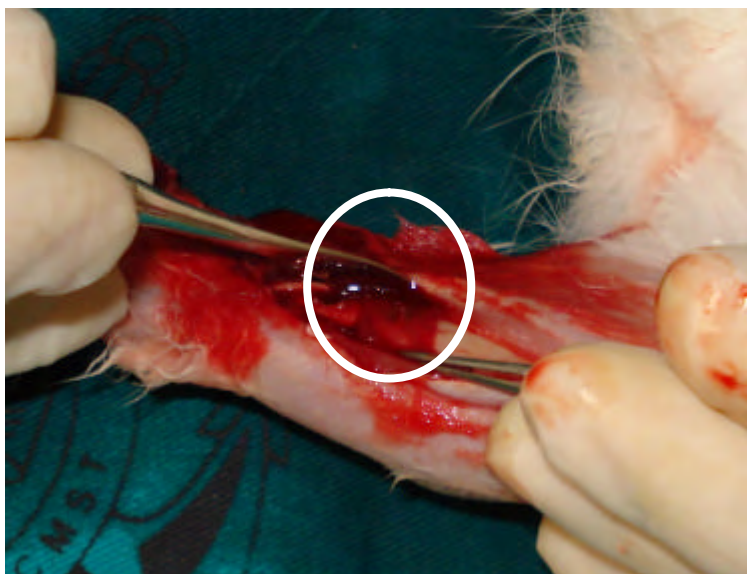


Fig. 12. Colocación de la membrana amniótica liofilizada como barrera en el defecto producido en las tibia del conejo.

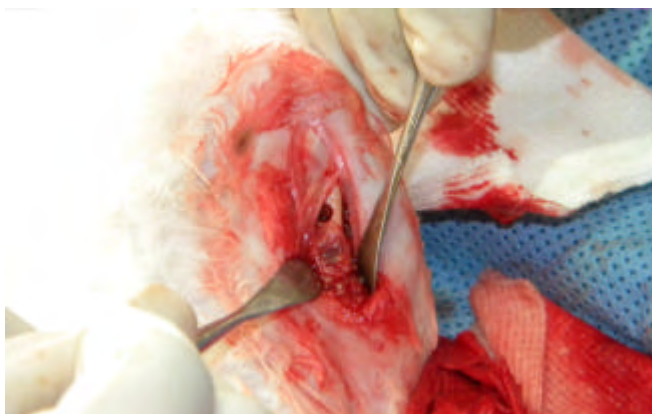


Fig. 13. Área de estudio (colocación del material en estudio) vs Área de control negativo (no se colocó ningún tipo de barrera)



Fig. 14. Sutura por planos, los planos más profundos con hilo reabsorbible, y el más superficial con hilo no reabsorbible.



Fig.15. Las muestras obtenidas fueron fijadas en formol por 24h.



Fig.16. Las muestras fueron luego descalcificadas con Ácido clorhídrico



Fig.17. Finalmente se terminó la descalcificación con Ácido Nítrico al 10%.

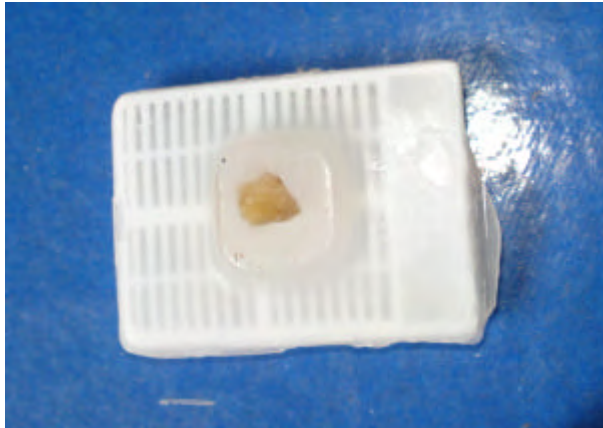


Fig. 18. Muestras envueltas en parafina para realizar el corte y la tinción correspondientes.



Fig. 19. Con la ayuda de un micrótopo se realizaron los cortes correspondientes para posteriormente realizar la tinción con H-E.

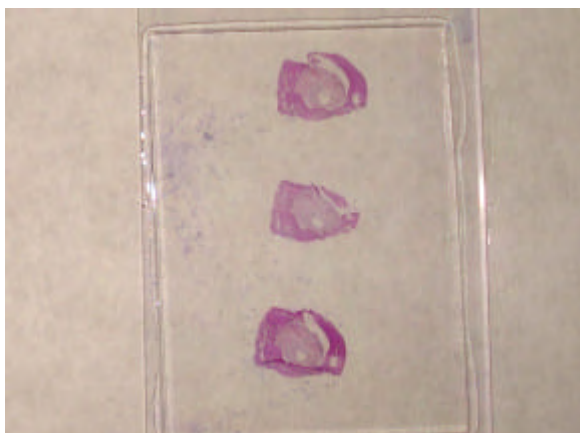


Fig. 20. Muestras con tinción H-E listas para la observación microscópica

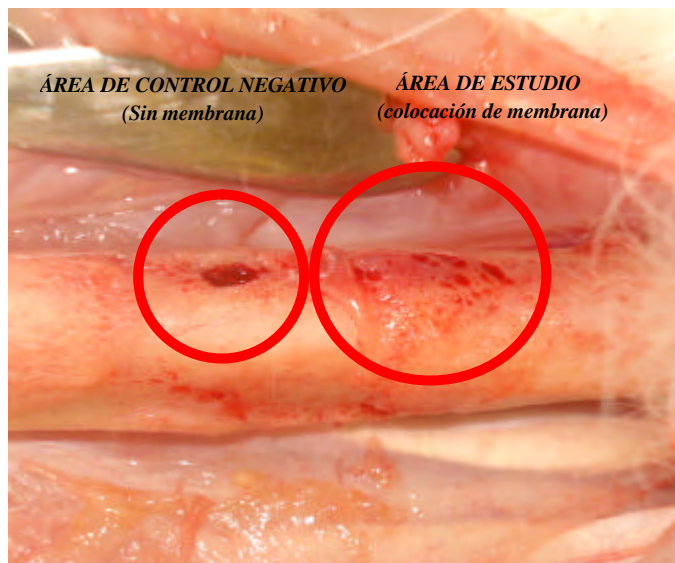


Fig. 21. Imagen clínica de las áreas de estudio y trabajo después de 6 semanas de cicatrización.

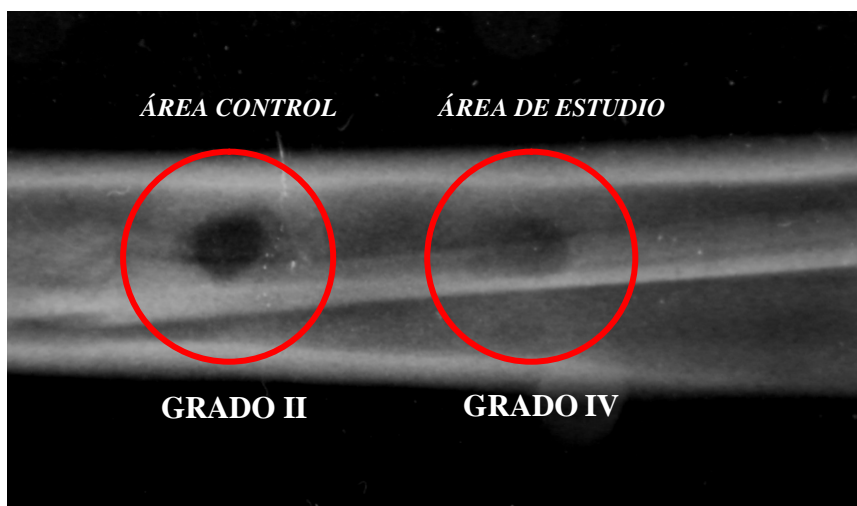


Fig. 22. Imagen radiográfica de las áreas de estudio y trabajo después de 6 semanas de cicatrización.

Fig. 23

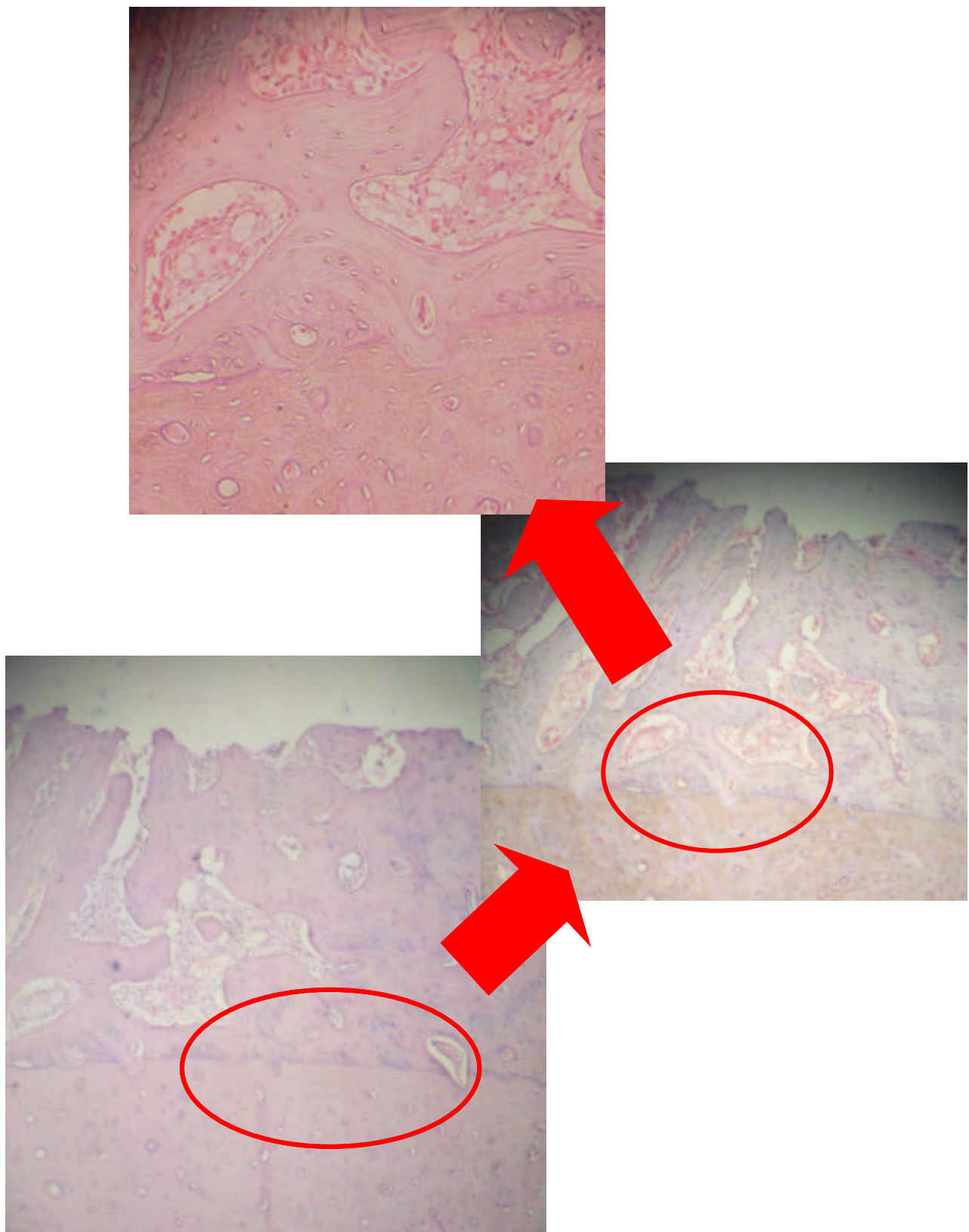


Fig.24 Imagen del área control en la cual se observa que no hay una continuidad entre el defecto y hueso normal, así mismo se observan la presencia de islotes aislados de hueso inmaduro , conjuntamente con la formación de espículas óseas a nivel de las paredes

